

Aus der Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
des Robert-Koch-Institutes Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hansjürgen Raettig

VERGLEICHENDE ORALE, NASALE UND REKTALE IMPFUNG
ON MÄUSEN MIT INAKTIVIERTEN S. TYPHI MURIUM-BAKTERIEN
MIT UND OHNE DIMETHYLSULFOXYD-ZUGABE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Renate Schmudde

aus Berlin

1968

AUS DER ABTEILUNG FÜR BAKTERIOLOGIE UND SEUCHEN-
FORSCHUNG DES ROBERT KOCH-INSTITUTES BERLIN
DIREKTOR : PROFESSOR DR.MED.HANSJÜRGEN RAETTIG

Vergleichende orale, nasale und rektale
Impfung von Mäusen mit inaktivierten
S. typhi murium-Bakterien mit und ohne
Dimethylsulfoxyd-Zugabe.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Renate Schmutde

aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hans Wolfgang Spier

Referent: Professor Dr.med. Hansjürgen Raettig

Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

promoviert am: 9.7.68

INHALTSVERZEICHNIS

S.

Aufgabenstellung	1
Grundsätzliche Erwägungen	2
Lokale Immunisierung - Wahl des Impfortes je nach Erreger - Zubereitung des Impfstoffes - Dimethylsulfoxyd (DMSO)	
Eigene Versuche	13
Material und Methoden: Versuchstiere - Impfstoff und Immunisierung - Überprüfung der Impfwirksamkeit - Infektion - Verträglichkeit der Impfungen Ergebnisse: Abbildungen und Tabellen	
Diskussion	34
Die Frage der Gewebsimmunität: Technik - unterschiedliche Resorptionskinetik - Kreislauf der Antigene - Faktoren der körpereigenen Abwehr DMSO als Adjuvans zur lokalen Immunisierung: Penetrationsvermittelnde Eigenschaft des DMSO - Schädigung des Makroorganismus - Schädigung des Mikroorganismus	44
Zusammenfassung.	54
Schrifttum	55



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUFGABENSTELLUNG

Die gute Wirksamkeit lokaler Immunisierungen ist in Tier- und Feldversuchen vielfach bewiesen. Insbesondere hält die orale Impfung gegen bakterielle Darminfektionen den Vergleich zur üblichen subkutanen Impfung aus, ist ihr sogar in entscheidenden Punkten überlegen (69). Dagegen ist die Wirkungsweise der lokalen Immunisierung noch weitgehend ungeklärt im Gegensatz zu dem besser erfassbaren Vorgang der humoralen Antikörperbildung, die als Gradmesser der Wirksamkeit parenteraler Impfungen meist benutzt wird. Die Grundlagenforschung zur lokalen Immunisierung hat sich zum Ziel gesetzt, die immunbiologischen Vorgänge beim Kontakt des Immunogens mit der Schleimhaut aufzuhellen und sein weiteres Schicksal nach der Resorption zu verfolgen. Im Rahmen dieses Forschungsziels hatte ich die Möglichkeit, zwei Teilfragen tierexperimentell zu bearbeiten.

Zunächst wurde geprüft, ob das lokal beimpfte Gewebe eine eigene, auf dieses Gewebe beschränkte Abwehr ausbildet. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wurde ein Impfstoff gegen eine bakterielle Darminfektion oral, nasal und rektal verabreicht, später dann zur Erfolgskontrolle oral infiziert. Bestehen Unterschiede im Wirkungsgrad dieser verschiedenen applizierten Impfstoffe? Gibt es einen deutlichen Impfschutz nur bei Benutzung der Oberflächen, zu denen der Erreger eine spezifische Affinität hat?

Außerdem wurde untersucht, ob sich der Impferfolg der lokalen Immunisierung durch Zusätze zum Impfstoff aus inaktivierten Bakterien noch verbessern

läßt. Möglicherweise könnte die Resorption des Impfstoffes durch die Schleimhäute gesteigert werden, oder es könnten die immunogenetischen Eigenschaften des Impfstoffes gefördert werden. Hierzu erschien Dimethylsulfoxyd (DMSO) wegen seiner Eigenschaften als Penetrationsvermittler und Lösungsmittel besonders geeignet.

GRUNDSÄTZLICHE ERWÄGUNGEN

Heute wird der Begriff "lokale Immunisierung" rein technisch im Unterschied zur "parenteralen Immunisierung" angewandt. Bei der parenteralen Immunisierung wird das Integument des Körpers künstlich umgangen, indem das Immunogen subkutan, intrakutan, intravenös oder intramuskulär geimpft wird. Bei der lokalen Immunisierung wird der Impfstoff auf die intakte Körperoberfläche, Haut oder Schleimhaut, auf gebracht. In der Regel werden die Oberflächen benutzt, die gegenüber dem Erreger primär empfindlich sind. Dabei nimmt man an, daß das Immunogen bei seiner Passage durch die Haut oder Schleimhaut einen örtlichen Reiz hervorruft mit der Reaktion, daß derselbe Weg als Eintrittspforte für nachfolgende Keime ungangbar wird. Schon 1905 schlugen v. WASSERMANN und CITRON (93) ganz konkret vor, Erkrankungen durch Bakterien, die eine bestimmte Eingangspforte besitzen - wie zum Beispiel Cholera- und Typhusbakterien den Digestionstrakt - am einfachsten zu verhindern, indem eine lokale Immunität dieser Eingangspforte erzeugt wird. Sie waren aufgrund von Tierversuchen zu der Überzeugung gelangt, daß die Zellen, die zuerst Kontakt mit dem Immunogen erhalten, auch imstande seien, den Einbruch der Erreger durch Bildung von Antistoffen zu lokalisieren. BESREDKA, aus

der Schule METSCHNIKOFFs stammend, begründete selbst die Schule der "lokalen Immunität" (3): Er lehnte es ab, alle Erscheinungen der natürlich erworbenen Immunität auf Antikörper zu beziehen. Nach ihm entsteht die optimale Immunität durch Impfung des empfänglichen Organs, und seiner Meinung nach muß der lokalen Infektion die lokale Immunisierung entgegengesetzt werden, denn "jedes Bakterium hat seine Zelle und jede Zelle hat ihre Immunität" (2). Er konnte diesen Lehrsatz nicht theoretisch untermauern, entwickelte auch keine Vorstellungen darüber, was in der betreffenden Zelle vorgehen mag und durch welche Reaktionen sie immun wird. Allerdings scheinen seine Versuche mit der Milzbrandinfektion der Kuh eindeutige Beispiele einer Organ-, Gewebs- beziehungsweise zellulären Immunität zu liefern. Auch die Versuche von GAY (31) veranschaulichen diese Vorstellungen einer lokalen Immunität in idealer Weise. Er experimentierte mit *Str. pyogenes*, der pleural gegeben ein Pleuraempyem, intravenös gegeben eine Sepsis und intradermal gegeben ein Erysipel verursacht. Bei pleuraler Immunisierung mit *Str. pyogenes*-Antigen war das Tier wohl gegen ein Pleuraempyem geschützt, nicht aber gegen eine Sepsis oder ein Erysipel. Bei intravenöser Immunisierung erkrankte das Tier nicht mehr an Sepsis, wohl aber an Pleuraempyem und Erysipel. Bei intradermaler Applikation des Antigen schließlich erstreckte sich der Impfschutz lediglich auf das Erysipel. In Ansätzen ist versucht worden, das Phänomen der lokalen Immunität zu erklären. Eine Fülle lokal nachzuweisender Abwehrsysteme ist beschrieben und diskutiert worden; eine überzeugende Theorie rein lokaler Abwehrmechanismen ist aber meines Wissens bisher nicht

entwickelt worden. Bemerkenswert dürfte immerhin die Annahme sein, daß Bausteine der Erreger bei dem ersten Kontakt in die Zellen des primär empfänglichen Gewebes eingebaut werden und sie immunisieren (69). Dieser Mechanismus ist bekannt von dem Prophageinbau in lysogene Bakterien, der diese Bakterien gegen einen weiteren Virusbefall spezifisch immun macht (16).

Der Annahme eines rein lokalen Abwehrmechanismus der einzelnen Organe bei der lokalen Immunisierung stehen vor allem auch zwei Argumente entgegen. Erstens treten auch nach lokalen Immunisierungsmethoden Antikörper im strömenden Blut auf; es müssen also humorale Allgemeinreaktionen erfolgt sein. Zweitens gelangen auch lokale Immunisierungen, die sich nicht der primär für den Erreger empfindlichen Oberflächen zur Impfung bedienen, also erstreckt sich der Schutz durch lokale Impfung nicht nur auf das entsprechende Gewebe. Man ist sich deshalb heute darüber einig, daß nach lokaler Impfung eine allgemeine Immunitätsreaktion des Makroorganismus eintritt und daß BESREDKAs These der alleinigen zellulären Immunität des Gewebes nach lokaler Antigenanwendung nicht mehr vertreten werden kann. Aus vergleichenden Feldversuchen (67) möchte man aber doch schließen, daß eine lokale Impfung umfassendere Immunreaktionen in Gang setzt als die subkutane Impfung. Vielleicht ist der Wirkungsgradunterschied Ausdruck zusätzlicher Abwehrmechanismen lokaler Art.

Versuche zur lokalen Immunisierung gelingen nur dann, wenn bestimmte Wirkungsfaktoren berücksichtigt werden. RAETTIG hat ein Versuchsmodell ausgearbeitet, in dem die wichtige Frage der Impfstoffdosierung, des Impfrhythmus und der Überprüfung des Impferfolges mittels Mortalitätsstatistiken gültig festgelegt wurden (68, 71,73). Wichtig ist vor allem die Wahl eines Infektions-

modelles, das die Überprüfung des Impferfolges durch eine auf natürlichem Wege gesetzte Infektion gewährleistet. Die übliche Messung des Antikörpertiters im strömenden Blut nach einmaliger Impfung ist weder zeitlich noch mengenmäßig ein Maßstab für die belastbare Immunität; dies haben zahlreiche Autoren, die lokal impften, beschrieben (2,5,6,71, 90). Der Anteil der lokalisierten Abwehrmechanismen an der Gesamtheit der körpereigenen Abwehr dürfte bei lokaler Immunisierung besonders groß sein und wird am besten durch lokale Infektion erfaßt. Weitere zwei Faktoren wurden in den vorliegenden Versuchen hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Wirkungsmechanismus der lokalen Immunisierung untersucht.

Von den meisten Autoren wird entsprechend den zellulär orientierten Vorstellungen über den Aufbau einer Gewebsimmunität der Wahl des Impfortes je nach Erreger besonderer Wert beigemessen. So wird von den meisten Untersuchern das Typhus-Antigen verfrachtet. Vereinzelt wurde aber auch über die Haut gegen Typhus immunisiert, so von LUMIERE und CHEVROTIER, LÖWENSTEIN, HOJO, MIZUTANI, MAZUMOTO (zitiert nach 69) und IBRAHIM (40). Über den Respirationstrakt immunisierten PFENNINGER, MAZUMOTO (zitiert nach 69), MIZUTANI (59), WALSH et al. (92), VAN DE LOO (53) und MARWIK (56). Rektale Immunisierungsversuche unternahmen COURMONT und ROCHAIX (7) und MIZUTANI (60). FINDER et al. (24) haben sogar vaginal gegen Typhus geimpft. Diese Versuche zeigen, daß auch andere Gewebe als die oberen Darmabschnitte für das Typhusantigen durchgängig sind, und durch diesen Kontakt allgemeine Immunitätsreaktionen in Form von humoralen Antikörpern nachweisbar sind. Daraus ergibt sich zwangsläufig die Frage, ob bei sonst gleichen Bedingungen graduelle Unterschiede

in der Wirksamkeit desselben Impfstoffes, an verschiedenen Körperstellen lokal angewandt, auftreten. Ist der Impferfolg deutlich besser bei Benutzung der Oberflächen, für den der Erreger primär empfänglich ist? Vergleichende Untersuchungen über den Immunisierungseffekt an verschiedenen Orten applizierten Antigene liegen bereits vor. IBRAHIM (40) prüfte den Agglutiningehalt des Serums von Kaninchen nach intra- und subkutaner Injektion, Einreibung in die Haut und Einträufelung in die Nase von hitzeinaktivierten Typhusbakterien. Mit der per- und subkutanen Methode erzielte er etwa gleich gute Ergebnisse; die nasale Anwendung brachte mittlere Erfolge trotz geringerer Antigenmenge; die intrakutane Impfung war am wenigsten wirksam. WALDMANN (90) konnte bei Kaninchen eine Immunität gegen die intraduodenale Infizierung mit hitze- oder formol-inaktivierten Bac. enteritidis Breslau durch intravenöse, subkutane, intratracheale und intraduodenale Impfung erzielen. In den Infektionsbelastungsversuchen lieferten die intraduodenale und die intratracheale Impfung etwa gleich gute Ergebnisse vor den intravenösen und subkutanen Anwendungen; dagegen waren die Agglutinationstiter nach intravenöser Impfung deutlich höher als nach intraduodenaler Impfung. Morphologisch sichtbare Krankheitszeichen an der Schleimhaut, wie diffuse Enteritis und Lymphknotenveränderungen, waren bei den intraduodenal geimpften Tieren am geringsten ausgeprägt. Beide Autoren arbeiteten aber mit so wenigen Versuchstieren, daß allgemeingültige Schlüsse aus ihren Beobachtungen nicht gezogen werden können. In den vorliegenden Versuchen wurde dasselbe Immunogen zahlreichen weißen Mäusen oral, nasal und rektal appliziert, und jeweils der Schutzwert dieser verschiedenen Impfungen gegen-

über einer oralen Infektion bestimmt.

Schließlich ist die Wirksamkeit der lokalen wie auch der parenteralen Impfung sehr stark abhängig von der Zubereitung des Impfstoffes. Bei der parenteralen Immunisierung hat sich der Zusatz von Adsorbentien, zum Beispiel von Aluminiumhydroxyd, bewährt. Daher ist es bekannt, daß die Messung der in einem Impfstoff enthaltenen Antigenmenge keinen Aufschluß gibt über seine Wirksamkeit. Ein und dieselbe Antigenmenge kann ganz verschiedene Wirksamkeit besitzen je nach den weiteren Zusätzen. Als Ursache werden erwogen eine Veränderung des Antigen selbst (65), die Depotwirkung und die Vergrößerung des Antigens bis zur Mizelle (17). Es ist leicht einzusehen, daß die zeitliche Verzögerung der Resorption des Immunogens den Wirkungsgrad der parenteralen Immunisierung erhöht. Ebenso logisch erscheint es, daß man an den Schleimhäuten kein Depot setzen kann. Im Gegenteil muß man deshalb bei der lokalen Immunisierung dafür sorgen, daß das Immunogen schnell resorbiert wird und also nicht größtenteils unverändert wieder ausgeschieden wird. Ein Gewebe, das sich mit dem Impfstoff nicht auseinandersetzt, sondern ihn nur passieren läßt, wird sicher keine Abwehr ausbilden. Es kommt also darauf an, die Resorption zu beschleunigen und damit den Kontakt mit den immunkompetenten Zellen der Schleimhaut zu vergrößern.

Die inaktivierten Salmonellen sind unbewegliche Partikel von einem bis mehreren μ Teilchendurchmesser; ihre in der Zellwand lokalisierten Antigene haben ein Molekulargewicht von 10 - 20000.

Alle Mikroorganismen bestehen aus organischen Substanzen, die normalerweise der Verdauung anheimfallen. Lebende, vermehrungsfähige Bakterien scheinen

sich vor der enzymatischen Verdauung im Magen-Darm-Kanal schützen zu können (49). Inwieweit dies auch abgetöteten, nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen gelingt, ist unklar. Möglicherweise werden Spaltprodukte des Bakteriums mit antigenetischen Eigenschaften von den Darmwandzellen resorbiert, in der Zelle dann genetisch verankert, wodurch diese Zelle dann spezifisch immun wird (16).

Einem Teil der Bakterien gelingt es sicher durch besondere Umstände, sich der Verdauung zu entziehen. Wiederum ein Teil davon wird sicher durch parazelluläre Resorption in tiefere Schichten der Schleimhaut gelangen und so immunogenetisch wirksam werden. Versuche von VOLKHEIMER (88) bestätigen alte Befunde (87), daß Teilchen bis zu 95 μ Durchmesser regelmäßig über den Magen-Darm-Kanal resorbiert werden. Allein die Größendifferenz zwischen den verwendeten Teilchen und der dem Darmlumen zugewandten Epithelzelloberfläche zeigt, daß keine zelluläre Resorptionsleistung vorliegen kann, sondern daß eine parazelluläre Immigration in das Stroma stattfinden muß. In Feinschnitten konnte gesehen werden, daß solche Korpuskeln vorwiegend im Bereich der Desquamationszonen des Darmepithels in das Stroma der Darmschleimhaut gelangen. Das Ausmaß dieser parazellulären Aufnahme von Korpuskeln ist unbestimmt. EBEL (13) nimmt an, daß etwa 0,1 % der verabreichten Menge so aufgenommen wird. Hunger, Erschöpfung, Durst und Entzündungen vermögen das Ausmaß dieser Resorption zu vergrößern (22, 23); ebenso manche Chemikalien, vor allem grenzflächenaktive Substanzen wie Galle und Alkohol (13). Bei der rektalen Applikation entfallen Verdauungsvorgänge. Die verabreichten Bakterien dürften auf rein parazellulärem Wege in den Makroorganismus gelangen und dort eine Immunreaktion bedingen.

Über den Respirationstrakt werden wahrscheinlich alle Substanzen resorbiert, wenn sie als Aerosol mit einer Teilchengröße von weniger als 5 μ inhaliert werden (77). FICKER (21) hat schon frühzeitig gezeigt, daß über den Atemtrakt im Vergleich zum Magen-Darm-Kanal verhältnismäßig viel Bakterien in den Organismus gelangen.

Eine Verbesserung des Impferfolges der lokalen Immunisierung läßt sich sicher theoretisch durch eine Erleichterung der Resorption des Immunogens über die Schleimhäute erzielen. Man hat sich dazu bereits verschiedener Methoden bedient. Erstens versuchte man auf mechanischem Wege durch Zerlegung des Bakteriums in seine einzelnen antigenetischen Bestandteile kleinere Partikel zu gewinnen, die sicher leichter und in größerem Maße resorbiert werden. FRATTINI (26) arbeitete mit verschiedenen Fraktionen von *S. typhi*. Die getrocknete Glukolipidfraktion des Erregers soll, oral angewendet, ein sehr gutes und haltbares Antigen sein. DEMPE (9) benutzte zur oralen Immunisierung Bakterienlysate, die durch Aufschluß der lebenden Keime gewonnen waren. Das Antigen war so sehr leicht resorbierbar, selbst durch Einträufeln in die Lidspalte konnte Agglutininbildung hervorgerufen werden. Im Infektionsversuch konnte ein starker Schutz durch Pneumokokkenlysat vor einer Infektion mit lebenden Pneumokokken beobachtet werden.

Zweitens wurden verschiedene Chemikalien benutzt, die erfahrungsgemäß die Schleimhäute so verändern, daß sie durchlässiger werden. Die ersten Bemühungen in dieser Richtung machte BESREDKA (2, 3). Er propagierte die Fütterung von Galle vor der lokalen Immunisierung. In seinen Versuchen überlebten nur

die Kaninchen eine Infektion, die mit Impfstoff und Galle vorbehandelt waren, Impfstoff allein war nicht ausreichend. BESREDKAS Versuche sind von vielen Autoren nachgeprüft und bestätigt worden, so von DIETRICH (10) und MIZUTANI (60). Andere kritisieren die Vorbehandlung als zu toxisch, so LUSENA und ROVIDA (54) und ISHIHARA (zitiert nach 60). Sie sahen dabei schwere Durchfälle und Colibacillose. Andere schonendere Substanzen wurden zur "Sensibilisierung" vorgeschlagen. Inaktivierte Dysenteriebakterien wurden von KLÜCHIN und WIGODSCHIKOFF (46) und MIZUTANI (60) benutzt. Unter dem Oberbegriff "Hydrotropika" lassen sich verschiedene andere verwendete Chemikalien zusammenfassen: Natrium benzoicum, mit dem WASSERMANN und NEUBERG (zitiert nach 60), REITER (75) und FRÄNKEL und SCHULZ (25) arbeiteten; Natrium bicarbonicum, das DIETRICH (zitiert nach 60) benutzte und Saponin, mit dem BECKER (zitiert nach 60) experimentierte. Verallgemeinernd können diese Versuche dahingehend zusammengefaßt werden, daß die benutzten Substanzen die Darmdurchlässigkeit steigern; unter Umständen steht dieser die Immunisierung zweifellos befördernden Wirkung aber eine Schädigung der antigenetischen Eigenschaften des Impfstoffes gegenüber. In den vorliegenden Versuchen wurde erstmals Dimethylsulfoxyd (DMSO) zur Verbesserung der lokalen Immunisierung verwandt.

DMSO ist eine klare farblose Flüssigkeit von schwachem Geruch und geringer Flüchtigkeit. Es ist eine stark hygroskopische Substanz, in Wasser unter Wärmebildung leicht löslich. Es läßt sich aber auch mit allen üblichen organischen Lösungsmitteln gut mischen.

Siedepunkt: 189°C bei 760 mm Hg. Dampfdruck:
0,37 mm Hg bei 20° C. Spezifisches Gewicht:
1,00 bei 20° C.

DMSO wurde erstmals 1866 von SAYTZEFF synthetisiert. In der Technik wird es seit Jahren als vielseitiges Lösungsmittel gebraucht sowie zur selektiven Trennung von aromatischen Kohlenwasserstoffen, als Lackentferner und Gefrierschutzmittel. Ab 1959 wurde es in der biologischen und seit 1960 auch in der klinischen Forschung erprobt. Seine wichtigsten biologischen Fähigkeiten seien hier in der Reihenfolge ihrer zeitlichen Erforschung kurz referiert.

DMSO ist ein Schutzmittel, das biologische Gewebe gegen Schäden beim Einfrieren und Wiederauftauen bewahrt (18, 78, 96). DMSO wirkt analgetisch und abschwellend (42).

Sehr wichtig ist der Einfluß des DMSO auf biologische Membranen. JACOB und Mitarbeiter (41) berichteten erstmals, daß DMSO selbst schnell durch biologische Membranen resorbiert wird und die Resorption in DMSO gelöster Stoffe begünstigt. Ihre Beobachtungen wurden von verschiedenen Autoren (8, 34, 83) bestätigt. Auf Grund dieser Befunde war es naheliegend, DMSO allein oder als Wirkstoffträger für verschiedene Medikamente, zum Beispiel antibiotische oder psychoaktive Substanzen anzuwenden (91, 39).

DMSO hat auch bemerkenswerte bakteriologische Eigenschaften. Es ist in Konzentrationen von mehr als 20 % baktericid für einige Mikroorganismen (51, 86). Es gelingt, säurefeste Bakterien durch in DMSO gelöste Farbstoffe zu färben (63). Außerdem gelingt die Extraktion von Bakterienantigenen mit DMSO (1, 32, 64). DMSO aktiviert Sporen von *Bac. panthoteti-*

cus bei Zimmertemperatur sehr schnell zu germinativen Formen (94). In Parallelversuchen zu den vorliegenden wurde DMSO als Adjuvans bei der lokalen Immunisierung auch von RAETTING, TSCHÖPE und NEUMANN-SCHÖNWETTER verwandt (72). Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, daß die immunisierenden Keime mittels der penetrationsfördernden Wirkung des DMSO leichter die Darmwand durchdringen oder zumindest durch DMSO extrahierte Bakterienantigene in größerem Ausmaß resorbiert werden.

Ansichts der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten wurden umfangreiche Tierversuche zur Bestimmung der Toxizität und von Nebenwirkungen vorgenommen (19, 35, 42, 45, 55, 79, 95). Alle auftretenden Erscheinungen lassen sich auf die hygroscopischen Eigenschaften der Substanz zurückführen. DMSO entzieht dem Gewebe Wasser und schädigt es dadurch. Generalisierte Systemschäden wurden nicht beobachtet. Neben der akuten Toxizität einzelner Maximaldosen wurden insbesondere auch die Verträglichkeit sublethaler Dosen auf längere Dauer untersucht. Die veröffentlichten Werte über Toxizitätsuntersuchungen an Mäusen liegen für die LD_{50} nach oraler Applikation von 90%igem DMSO zwischen 16,5 und 21,4 g/kg Körpergewicht. Diese Toxizitätswerte sind abhängig von der Applikationsgeschwindigkeit und der Umgebungstemperatur. Erst nach Verabreichung von einem Viertel oder der Hälfte der LD_{50} täglich über 16 Wochen wurden Verminderung der Gewichtszunahme, Schädigungen des weißen Blutbildes, eine Follikelatrophy in der Milz und Todesfälle beobachtet.

EIGENE VERSUCHE

In sechs Versuchsreihen mit insgesamt etwa 1800 Tieren wurde parallel in jeweils demselben Versuchsansatz die Bedeutung des Impfortes und der Einfluß von DMSO-Zusatz zum Impfstoff hinsichtlich des Schutzes vor einer oralen Infektion geprüft. Alle sechs Versuche wurden prinzipiell in derselben Weise angeordnet, nur wurden sie zeitlich nacheinander von Dezember 1965 bis April 1966 ausgeführt.

1) Material und Methoden:

Versuchstiere: Die Experimente wurden an NMRI-Mäusen (Naval Medical Research Institute) beiderlei Geschlechts aus der Zucht des Robert Koch-Institutes und des Forschungslabors der Schering AG ausgeführt. Das Gewicht der Tiere lag bei Versuchsbeginn im Durchschnitt bei 18 g. Während des Versuches blieben die Tiere ohne jedes Umsetzen zu je 20 - 30 in Plastikkäfigen. Sie erhielten Trockenfutter "Altromin" und Leitungswasser. Die Kontrolltiere wurden unter denselben äußeren Bedingungen gehalten.

Impfstoff und Immunisierung: Als Immunogen diente ein von den Behringwerken hergestellter Trockenimpfstoff aus drei *S. typhi murium*-Stämmen (Nr. 366, 369, 371). Durch zweistündiges Erwärmen der Bakterienkulturen auf 60° C und anschließende Lyophilisation war dieser Impfstoff gewonnen worden. In jeweils 1 g Trockenmasse waren $3,75 \times 10^{12}$ Keime enthalten. Dieser Trockenimpfstoff wurde von uns entweder mit Wasser oder mit DMSO zubereitet; geringfügige Unterschiede ergaben sich noch auf Grund der verschiedenen Applikationsorte.

Orale Impfung: Der Impfstoff wurde in flüssiger Form verabreicht. Je 1 g des Trockenimmunogens wurde entweder in 125 ml physiologischer Kochsalzlösung oder in 125 ml 30 %-iger wäßriger DMSO-Lösung suspendiert. Von diesen Präparationen erhielt jede Maus an zehn aufeinanderfolgenden Tagen je 0,25 ml tieforal mit der Sonde gefüttert. Dabei wurde zur Vermeidung von Verletzungen eine gebogene Sonde mit einer Olive am Ende verwendet, die als "Analbeutelkanüle" in der Veterinärmedizin bekannt ist (36). Die Dosierung konnte mittels Rekordspritze sehr genau vorgenommen werden. Jedes mit DMSO behandelte Tier erhielt als Einzeldosis ca. 13,8 ml 30%-iges DMSO pro kg Körpergewicht.

Nasale Impfung: Auch hier wurde eine flüssige Zubereitung des Impfstoffes verwandt. Je 1 g des Trockenimpfstoffes wurden entweder in 50 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung oder in 50 ml 90%-igem DMSO suspendiert. Es wurde zehnmal mit je ca. 0,1 ml geimpft. Jedes DMSO-Versuchstier erhielt also als Einzeldosis ca. 5,5 ml 90%-iges DMSO pro kg Körpergewicht. Dem in Rückenlage gehaltenen Tier wurde je ein Tropfen des Impfstoffes aus einer stumpf abgeschliffenen Kanüle auf jedes Nasenloch gesetzt. Diese Tropfen wurden in der Regel aspiriert. In Einzelfällen ging ein Teil des Impfstoffes durch Schnauben verloren oder wurde abgeleckt.

Rektale Impfung: Rektal wurde der Impfstoff als Gel in halbflüssiger Form appliziert. Je 1 g der Trockensubstanz wurde mit 50 ml Carbopol^R-Gel gemischt oder mit 50 ml 30%-igem Dolicur^R-Gel. Carbopol ist die chemisch und biologisch inaktive Träger-substanz für dieses DMSO- Präparat der Schering AG. Von diesen Zubereitungen erhielt jedes Tier zehnmal je 0,1 ml als Klistier verabreicht, ebenfalls mit

einer Analbeutelkanüle, die möglichst vorsichtig und tief ins Rektum eingeführt wurde. Um das sofortige Wiederauslaufen des Klysmas zu verhindern, wurde der Anus einige Minuten zugehalten. Es konnte aber auch so nicht in allen Fällen vermieden werden, daß die nächste Darmentleerung so bald erfolgte, daß große Mengen des Gels ausgeschieden wurden. Es wurde dann teilweise aufgeleckt. Die DMSO-Tiere erhielten hierbei als Einzeldosis zirka 5,5 ml 30%-iges DMSO pro kg Körpergewicht.

Zusammenfassend sei darauf hingewiesen, daß bei allen drei Applikationsformen nach abgeschlossener Immunisierung jedes Tier etwa gleiche Mengen Immunogen erhalten hatte, nämlich $7,5 \times 10^{10}$ Keime. Die verabreichten DMSO-Mengen unterschieden sich wie folgt: Oral wurde den Tieren insgesamt zirka 138 ml 30%-iges DMSO pro kg Körpergewicht, nasal zirka 55 ml 90%-iges DMSO pro kg Körpergewicht und rektal zirka 55 ml 30%-iges DMSO pro kg Körpergewicht gegeben.

Überprüfung der Impfwirksamkeit: Der Impferfolg wurde an der Absterbeordnung der Versuchstiere nach oraler Infektion mit dem homologen Keim gemessen. Die Vergleichsgröße war die Absterbeordnung der ungeimpften Kontrolltiere. Es wurde der Zeitraum bis zum 23. Tage nach Infektion beobachtet.

Infektion: Am 10. Tag nach der letzten Immunisierung erhielten gleichzeitig die geimpften Tiere und die bis dahin unbehandelten Kontrollen eine einmalige Infektionsdosis von 0,25 ml einer 24-stündigen Brühkultur von virulenten *S. typhi murium*-Bakterien tieforal mit der Sonde. Der Titer lag bei etwa 10^9 virulenten Keimen pro ml. Angestrebt war eine 50%-ige Mortalität bei den Kontrolltieren. Erwartungsgemäß schwankte die Virulenz um diesen Mittelwert.

Verträglichkeit der Impfungen: Diese soll unter besonderer Berücksichtigung des ersten Versuches erörtert werden, der im folgenden als Vorversuch von den fünf übrigen Hauptversuchen abgetrennt und gesondert behandelt wird. In diesem Vorversuch wurde sowohl oral als auch nasal und rektal 90%-iges DMSO als Impfstoffzusatz verwandt. Wegen der auftretenden toxischen Schäden mußte auf die in den Hauptversuchen gebrauchten Verdünnungen zurückgegangen werden. Die Tiere hatten bei der oralen Anwendung also eine einmalige Dosis von 13,8 ml 90%-iges DMSO/kg Körpergewicht erhalten, was nach vorliegenden Literaturberichten etwa 75-90 % der LD_{50} entspricht (35). Unsere Ergebnisse waren entsprechend: Von 49 Tieren waren nach 24 Stunden 24 tot und, obwohl bereits am zweiten Tag der Immunisierung auf die niedrige Dosierung zurückgegangen wurde, starben im Verlaufe der Immunisierung noch weitere Tiere, der Schaden wirkte also nach. Bei der rektalen Anwendung (5,5 ml 90%-iges DMSO/kg Körpergewicht) war das Ergebnis nicht ganz so dramatisch: Von 48 Tieren waren nach 24 Stunden 4 tot. Die nasale Anwendung derselben Menge wurde von allen Versuchstieren toleriert. Die Todesfälle traten immer unter denselben äußeren Anzeichen auf: Nachlassen von Spontanbewegungen und Abwehrreflexen, Benommenheit und Atemstörungen, Blutungen aus Urogenital- und Magen-Darm-Trakt. Bei der Sektion einzelner Tiere konnte festgestellt werden: Nach oraler Behandlung waren Dünn- und Dickdarm erschlafft und mit blutiger Flüssigkeit gefüllt, einzelne Dünndarmsegmente waren blutig imbibiert. Perforationen, etwa durch Einführung der Sonde, konnten nicht beobachtet werden. Von Herz, Leber, Lunge und den verschiedenen Darmabschnitten wurden Abstriche

bakteriologisch untersucht. Interkurrente Infektionen konnte nicht nachgewiesen werden.

Im weiteren Verlauf der Immunisierung fiel auf, daß alle geimpften Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Körpergewichtszunahme zurückblieben und schlechter gediehen. Zur Objektivierung dieser äußerlich sichtbaren Zeichen wurden die Tiere des vierten und fünften Hauptversuches am Tage der Infektion zu je zehn Tieren aus den verschiedenen Behandlungsgruppen gewogen. Bei den mit dem bisher üblichen Impfstoff behandelten Tieren war der Unterschied zum Gewicht der Kontrollen gering, aber mit 20 g pro 10 Tiere deutlich. Es ist anzunehmen, daß die Manipulationen während der Impfung, das Fixieren und die Sondeneinführung, diese Tiere in Mitleidenschaft gezogen haben. Bei den DMSO-Tieren dagegen wurden am 20. Versuchstage, das heißt am Tage der Infektion, gegenüber den Kontrolltieren Gewichtsunterschiede bis zu maximal 45 g pro 10 Tiere festgestellt. Hier ist das noch schlechtere Gedeihen mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Schädigung durch DMSO zurückzuführen. Verschiedene Autoren berichten gleichartige Beobachtungen (35, 79).

Bei den folgenden Versuchsergebnissen kann also berücksichtigt werden, daß die Kontrolltiere am Tage der Infektion etwas kräftiger entwickelt waren.

2) Versuchsergebnisse:

Sämtliche Versuche zusammenfassend kann gesagt werden, daß die weiße Maus gegen eine orale Infektion mit *S. typhi murium* durch spezifische orale, nasale und rektale Immunisierung in etwa gleichem Maße gut geschützt wird. Der Zusatz von DMSO zum Impfstoff

erbrachte keine Verbesserung der Impferfolge, sondern führte in allen Fällen zu schlechteren Ergebnissen. Im einzelnen sind die Versuchsergebnisse in vier Tabellen (I - IV) zahlenmäßig und statistisch erfaßt; in fünf Abbildungen (1 - 5) wurden sie graphisch dargestellt. Die Tabellen I und II enthalten die Daten der Einzelversuche, die Tabellen III und IV aus sämtlichen Hauptversuchen errechnete Mittelwerte. Alle Abbildungen sind Summendarstellungen sämtlicher Einzelversuche.

Die Tabelle I (Seite 24) wurde anhand der Versuchsprotokolle für die Einzelversuche zusammengestellt. Getrennt für den Vorversuch (I a) und die einzelnen zeitlich leicht verschobenen Hauptversuche (I b - I f) werden hier die wichtigsten Daten angegeben: Die Anzahl der Mäuse am Tage der Infektion, die der Infektion erlegenen Mäuse pro Tag, die Summe der toten Mäuse am 23. Tage nach Infektion und die aus diesen Werten berechnete Endsterblichkeit. Die Differenz der Mortalität zwischen den geimpften Versuchstieren und den unbehandelten Kontrollen wurde als Ausdruck des Impferfolges gewertet und zahlenmäßig als Wirkungsinde-
x nach der Formel $\frac{(b-a) \times 100}{b}$ eingetragen, wobei a die Mortalität der Immuntiere und b die Mortalität der Kontrollen angibt. Aus Tabelle I a ist besonders bemerkenswert die Anzahl der Mäuse am Tage der Infektion, aus der auf die Verträglichkeit des 90%-igen DMSO bei den verschiedenen Applikationen geschlossen werden kann. Bei Versuchsbeginn am ersten Tage der Immunisierung war die Anzahl der Mäuse in den verschiedenen Behandlungsgruppen etwa gleich groß, nämlich 50. Daraus ergibt sich, daß die orale Verabreichung besonders schlecht vertragen wurde

Tabelle II (Seite 26) gibt Aufschluß darüber, wie weit die fünf Einzelversuche von der großen Linie aller Versuche abweichen. Hier wurden die Wirkungsindices der sechs verschiedenen Impfstoffen für jeden Versuch einzeln und die darauf ermittelten Summenwerte zusammengestellt. Bei der Auswertung von Mittelwerten aus mehreren Einzelversuchen ist zwar ein schneller Überblick über die Ergebnisse zu gewinnen, aber dieses Verfahren kann zu falschen Schlüssen führen, wenn extreme Ergebnisse einzelner Versuche die Mittelwerte unstatthaft entstellen. Der Wirkungsindex ein und derselben Impfstoffart schwankte von Versuch zu Versuch teilweise erheblich. Nur die Impfstoffart "nasal ohne DMSO" zeigt ein ziemlich einheitliches Bild. Bei der konservativ oralen Methode aber stehen neben drei Versuchen mit sehr guter Wirksamkeit zwei Versuche, bei denen die Impfung praktisch keinen Erfolg hatte. Solche "Ausreißer" werden bei derartigen Tierversuchen häufig beschrieben, ohne daß man in der Regel Gründe dafür angeben kann. Die rektale Impfung ohne DMSO-Zusatz zeigt in einem Versuchsansatz überraschend den höchsten Schutzwert aller ausgeführten Versuche. Dieser offensichtliche Ausreißer bedingt das relativ gute Abschneiden dieser Impfstoffart gegenüber der rektalen DMSO-Impfung. In Wirklichkeit dürften diese beiden Anwendungen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen etwa den gleichen Schutzwert haben. Eine Korrelation zwischen der Virulenz des Erregers, die sich in der unterschiedlichen Mortalität der Kontrolltiere ausdrückt (Spalte 7) und dem von Versuch zu Versuch schwankenden Wirkungsgrad der Impfung ist nicht zu beobachten. Ein stärker virulenter Keim (Versuch IV und V) durchbricht die aufgebaute Immunität nicht in größerem Ausmaß als ein

weniger virulenter Keim (Versuch II).

In Tabelle III (Seite 27) wurden sämtliche wichtigen Werte aus den fünf Hauptversuchen summarisch zusammengestellt. Die Mittelwerte der Mortalität wurden ausgewertet: Die Mortalitätsdifferenzen der Immuntiere zu den Kontrolltieren und damit der Impferfolg wurden statistisch gesichert. Am 23. Tage nach Infektion beträgt die Mortalität der ungeschützten Tiere 63,0 % (Spalte 9). Alle Werte der geimpften Tiere lagen deutlich niedriger. Für die Mortalitätswerte am Ende des Versuches errechnet sich nach KOLLER (48) die höchstzulässige Zufallsdifferenz bei Annahme gleich großer Kollektive von durchschnittlich 220 Tieren mit 14,5 %.

In Spalte 10 ist die tatsächliche Differenz in der Mortalität der geimpften Tierkollektive zu den Kontrolltieren eingetragen. Sie ist in jedem Falle größer als 14,5; die Schutzwirkung ist also für alle sechs Impfanwendungen statistisch signifikant. Wesentliche Unterschiede im Wirkungsgrad der verschiedenen Impfanwendungen untereinander bestehen nicht. Die Endmortalität schwankt für den üblichen Impfstoff zwischen 40,8 (rektal) und 37,2 (nasal), diese Unterschiede liegen durchaus im statistischen Streubereich. Die prozentuale Endsterblichkeit für den DMSO-Impfstoff liegt bei allen drei Anwendungen deutlich höher, zwischen 48,2 (oral) und 41,2 (nasal). Die Unterschiede zum üblichen Impfstoff sind auch nicht statistisch signifikant, jedoch läßt das in allen Ansätzen gleichartige Ergebnis vermuten, daß es sich nicht um ein zufälliges Ergebnis handelt.

Zur genaueren Analyse des Impfschutzes wurden auch der mittlere Sterbetag, die für diesen Tag geltenden Mortalitätswerte (die auf statistische Signifikanz untersucht wurden) und die entsprechenden Wir-

kungsindices berechnet. RAETTIG und MARWIK haben diese Fragen für die orale und nasale Immunisierung genauestens untersucht und beschrieben (71, 56). Hier soll nur unter Hinweis auf den mittleren Sterbetag (Spalte 3) bestätigt werden, daß die Impfung den zeitlichen Ablauf der Absterbeordnung nicht ändert; die trotz der Impfung der Infektion erlegenen Tiere scheinen von der Impfung gar nicht beeinflusst zu sein. Die mittlere Überlebenszeit der Immuntiere gegenüber den Kontrollen ist nirgends wesentlich verlängert, teilweise sogar geringfügig verkürzt; das heißt, die verstorbenen geimpften Tiere erhielten auch keinen partiellen Schutz insofern als sie später starben als die Kontrolltiere.

Mortalitätsschwankungen während des Versuches, die die Charakteristika einer Kontaktepidemie aufwiesen, konnten ebenfalls beobachtet werden. Aufschluß darüber erhält man aus den Zahlen der pro Tag gestorbenen Immuntiere, die in Tabelle IV (Seite 28) eingetragen sind. Eine danach angefertigte Epidemiekurve würde entsprechend RAETTIGs Versuchen jeweils ebenfalls Vorschwankung, Gipfel und langsam abfallende Schenkel zeigen (71).

Nach den in Tabelle IV (Seite 28) zusammengestellten Summenwerten wurden die Abbildungen angefertigt, bei denen es sich ausnahmslos um Summenkurven handelt.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen vergleichend die Kurven der Absterbeordnung für die verschiedenen Applikationsorte; Abb. 1 für den üblichen Impfstoff, Abb. 2 für den DMSO-Impfstoff. In den Abbildungen 3 bis 5 sind für jeden Applikationsort einzeln die Absterbeordnungen mit und ohne Zusatz von DMSO zum Impfstoff aufgetragen.

Den Einfluß des Impfortes auf den Impferfolg zeigt am klarsten Abbildung 1 (Seite 29). Der übliche Impfstoff wurde oral, nasal und rektal verabreicht und die Absterbeordnung nach oraler Infektion für alle drei Anwendungsarten im Vergleich zur Absterbeordnung der Kontrolltiere aufgetragen. In einem deutlichen Abstand zur Kontrollkurve verlaufen die drei Immunkurven dicht beieinander; immerhin sind kleine Unterschiede erkennbar. Überraschend schneidet die nasale Impfung (Wirkungsindex 41,6) am günstigsten ab vor der oralen Impfung (Wirkungsindex 38,9) und der rektalen Impfung (Wirkungsindex 35,0).

Obwohl auch in Abbildung 2 (Seite 30) für die drei verschiedenen Impforte des DMSO-Impfstoffes die Absterbeordnungen veranschaulicht werden, so ist diese Abbildung doch eher zur Diskussion des DMSO-Einfluß auf die Impfungen geeignet. Das Feld der drei Immunkurven ist weiter gestreut; der Abstand zur Kontrollkurve geringer. Am auffälligsten ist das schlechte Ergebnis der oralen DMSO-Impfung. Die nasalen und rektalen Impfungen fallen zwar auch schlechter aus, aber der Unterschied zum üblichen Impfstoff ist nicht so groß.

Anhand der Abbildungen 3 bis 5 (Seite 31 - 33) können diese Unterschiede genauer aufgeschlüsselt werden. In Abbildung 3 sind die beiden Absterbekurven nach oraler Immunisierung eingetragen. Hier ist der Abstand zwischen den Impfungen mit und ohne DMSO am größten. Die Kurve der DMSO-Impfung steigt noch vor der Kontrollkurve langsam an, kreuzt diese etwa am siebenten Tage nach Infektion, um sich dann allmählich auf die Mitte zwischen der Kontrollkurve und der Kurve für die übliche orale Impfung einzupendeln. Nach der oralen DMSO-Impfung liegt der Wirkungs-

index mit 23,5 am niedrigsten, und die Endmortalität liegt mit 48,2 eben außerhalb des statistischen Streubereiches. Dagegen kommt die Mortalitätsdifferenz zwischen den beiden oralen Anwendungen mit 9,7 sogar dem für statistische Signifikanz geforderten Mindestwert von 14,5 ziemlich nahe. Diese Differenz ist für die nasalen Impfungen mit 4,0 bei Versuchsende deutlich geringer. Die beiden entsprechenden Kurven in Abbildung 4 verlaufen sogar bis zum fünfzehnten Tage nach Infektion ineinander verschlungen und trennen sich dann auch nur wenig. Für die rektalen Impfungen liegen die Verhältnisse, die Abbildung 5 wiedergibt, ähnlich. Die DMSO-Kurve steigt als erste an, verläuft zwischen dem neunten und zwölften Tage nach Infektion gemeinsam mit der anderen Immunkurve in deutlichem Abstand zur Kontrollkurve, steigt dann etwas steiler an und endet schließlich in einem Abstand von 2,9 zur anderen Immunkurve. Bei derartig nahe beieinanderliegendem Kurvenverlauf innerhalb des statistischen Streubereiches kann eigentlich von schlechteren Ergebnissen der DMSO-Impfung nicht gesprochen werden, allein die gleichartige Tendenz bei allen drei Anwendungen läßt diesen Schluß zu.

TABELLE I

	Impfart	Zahl Mäuse	Zahl Tote	Mort.% 23.Tag	Wirkungs- index	Tagesstote 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11.12.13.14.15.16.17.18.19.20.21.22.23.
Ia	oral	42	19	45,3	12,6	- - - - - 3 2 2 2 2 2 - 1 - 4 2 1 - - - - -
	nasal	49	20	40,8	21,5	- - - - - 2 1 1 3 2 2 4 - 3 1 1 - - - - 1 - 1
	rektal	46	18	39,1	24,6	- - - - - 4 - 5 2 - - - 2 - 1 - 4 - - - - -
	oral+DMSO	18	7	38,9	25,0	- - - - - - - - 1 2 1 - 1 - 1 1 - - - - -
	nasal+DMSO	47	25	53,2	--	- - - - - 3 2 5 3 3 1 - 2 1 1 1 1 1 - - 1 1 -
Vorversuch	rektal+DMSO	38	15	39,5	23,5	- - - 1 1 - 2 - 2 1 1 - - 1 1 1 1 1 - - 1 1 1
	Kontrollen	54	28	51,9	--	- 1 - - - 2 2 2 - 2 2 - 4 1 3 - 3 - - 6 - -
Ib	oral	35	9	25,7	59,3	- - - - - 1 1 2 2 2 - - - - - 1 - - - - -
	nasal	39	12	30,8	51,2	- - - - - 1 2 2 - - - 2 - 2 - 1 - - 1 1 - -
	rektal	35	6	17,1	72,8	- - - - - - - - 1 - - - - 1 - 2 - - - 1 - 1 -
	oral+DMSO	36	11	30,6	51,5	- - - - - 2 - 1 3 1 - - - - 1 - - - - 2 1 - -
	nasal+DMSO	39	8	30,8	51,2	- - - - - - 2 1 - - - - - 1 - - 2 - - 2 - -
1.Versuch	rektal+DMSO	30	17	56,7	10,1	- - - - - 1 1 - 2 1 - - 9 1 1 1 - - - - 1 - -
	Kontrollen	38	24	63,1	--	- - - 2 - 1 1 4 5 3 - - 3 - 3 - - - 1 - 1 -
Ic	oral	48	10	20,8	44,5	- - - - - 1 - 1 - 2 - - - 2 1 - - 2 - - 1
	nasal	52	9	17,3	53,7	- - - - - 1 - 2 2 - - - 3 - - 1 - - - - 1
	rektal	45	13	28,9	23,0	- - - - - 2 3 - - 1 - - 2 4 - 1 - - - - -
	oral+DMSO	47	16	34,0	9,3	- - - - - 2 - 1 2 - - - 4 2 1 - 1 - - - -
	nasal+DMSO	50	11	22,0	41,2	- - - - - 1 2 1 1 - - - 2 - 1 - 2 - - - 1 -
2.Versuch	rektal+DMSO	39	8	20,5	45,2	- - - - - 1 1 1 - - 3 1 1 - - - - - 1 -
	Kontrollen	56	21	37,5	--	- - - - - 2 1 5 4 - - 4 - - 1 1 - - - 2 1

Tabelle I

Impfart	Zahl Mäuse	Zahl Tote	Mort. % 23. Tag	Wirkungs- index	Tagestote 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11.12.13.14.15.16.17.18.19.20.21.22.23.
3. Versuch	oral	40	32,5	16,4	- - 1 - - 2 - 2 - - - 2 2 1 - - - 2 1 - - 2 1
	nasal	34	17,6	54,7	- 1 - - - 1 1 - - - 1 1 1 - - - - - -
	rektal	35	28,6	26,4	- - - - 2 - 1 2 - - - 1 3 - 1 - - - - -
	oral+DMSO	38	34,2	12,1	- - - - 1 - 1 2 2 - 2 3 - - - 1 - - 1 -
	nasal+DMSO	36	38,9	--	- - - - - - 3 4 - 2 - 1 2 1 1 - - - - -
	rektal+DMSO	31	29,0	25,4	- - - - - 1 2 2 - - - 1 1 1 1 - - - - -
	Kontrollen	36	38,9	--	- 1 - - - 2 - 1 3 - - 3 3 - - - - - 1
4. Versuch	oral	49	63,2	26,5	- - - - 2 2 2 5 8 5 - - - 4 - 2 - - 1 - - -
	nasal	51	39,2	54,5	- - - - 1 4 4 3 4 - - - 2 - - 1 - - 1 -
	rektal	54	61,1	29,0	- - - - 3 3 4 9 6 4 - - - 4 - - - - - -
	oral+DMSO	48	72,9	15,4	- - - - 2 5 5 4 9 2 - - - 5 2 1 - - - -
	nasal+DMSO	49	63,2	26,5	- - - - - - 3 6 8 6 - - - 5 - 1 - 1 - 1 -
	rektal+DMSO	50	42,0	51,1	- - - - - - 5 6 4 2 - - - 2 1 1 - - - -
	Kontrollen	50	86,0	--	- - - - - 4 4 12 7 2 - - - 4 4 3 2 - 1 - -
5. Versuch	oral	47	44,7	47,9	- - - - - 2 1 5 2 3 2 2 - 2 1 - - - 1 - -
	nasal	47	74,5	13,4	- - - - 1 2 1 8 6 3 1 4 4 1 1 - 3 - - - -
	rektal	49	55,1	35,8	- - - - 2 2 2 7 1 3 1 1 1 1 1 2 - 2 - - -
	oral+DMSO	49	61,2	28,8	- - - - - 5 5 2 2 3 2 1 3 - 2 1 1 2 - 1 2 -
	nasal+DMSO	48	56,2	34,6	- - - - 1 1 5 3 1 1 2 - 3 4 4 - 2 - - - -
	rektal+DMSO	49	65,3	24,1	- - - - 2 2 2 7 7 3 2 1 1 1 2 - 1 - 1 - -
	Kontrollen	50	86,0	--	- 1 - - 1 2 9 7 4 2 6 3 - 2 2 2 - 1 - 1 -

TABELLE II

Versuch Nr.	Wirkungsindices $\frac{(b-a) \times 100}{b}$						Mort. %
	oral	nasal	rektal	oral+DMSO	nasal+DMSO	rektal+DMSO	
1	2	3	4	5	6	7	8
1	59,3	51,2	72,8	51,5	66,2	10,1	63,1
2	44,5	53,5	23,0	9,3	41,2	45,2	37,5
3	16,0	54,9	26,4	12,1	--	25,4	38,9
4	2,6	54,5	29,0	15,4	26,5	51,1	86,0
5	47,9	13,2	35,8	28,8	34,6	24,1	86,0
Summe	38,9	41,6	35,0	23,5	34,7	30,0	63,0

TABELLE III

Impfart	Zahl der Mäuse	mittlerer Sterbetag	12 Tage nach Infektion				23 Tage nach Infektion			
			Zahl der Toten	Mort. %	Diff. z.M. der Kontr.	Wirkungsindex	Zahl d. Toten	Mort. %	Diff. z.M. d. Kontr.	Wirkungsindex
1	2	3	4	5	6*	7	8	9	10*	11
oral	219	11,83	54	24,7	17,0	40,8	84	38,4	24,6	38,9
nasal	223	11,57	51	24,4	17,3	45,3	83	37,2	25,8	41,6
rektal	218	11,24	59	27,0	14,7	32,2	89	40,8	22,2	35,0
oral+DMSO	218	11,77	65	29,8	11,9	28,5	105	48,2	14,9	23,5
nasal+DMSO	221	12,24	54	24,4	17,3	41,5	91	41,2	21,8	34,7
rektal+DMSO	199	11,27	55	27,6	14,1	33,8	87	43,7	19,3	30,0
Kontrollen	230	11,45	96	41,7	--	--	145	63,0	--	--

* zu Spalte 6 und 10: Höchstzulässige Zufallsdifferenz nach KOLLER = 14,5 %

TABELLE IV

	oral			nasal			rektal			oral+DMSO			nasal+DMSO			rektal+DMSO			Kontrollen		
	*	**	***	*	**	***	*	**	***	*	**	***	*	**	***	*	**	***	*	**	***
1	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--
2	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--
3	-	--	--	1	1	0,4	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	2	2	0,9
4	1	1	0,5	-	1	0,4	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	2	4	1,7
5	-	1	0,5	-	1	0,4	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	4	1,7
6	3	4	1,8	1	2	0,9	5	5	2,3	4	4	1,8	1	1	0,5	3	3	1,5	2	6	2,6
7	6	10	4,6	4	6	2,7	9	14	6,4	6	10	4,6	2	3	1,4	3	6	3,0	7	13	5,7
8	6	16	7,3	9	15	6,7	9	23	10,5	13	23	10,5	12	15	6,8	9	14	7,0	21	34	14,8
9	11	27	12,3	15	30	13,4	17	40	18,1	16	39	17,9	14	29	13,1	18	32	16,1	25	59	25,6
10	15	42	19,2	11	41	18,4	10	50	22,9	15	54	24,8	14	43	19,5	15	47	23,6	20	79	34,4
11	9	51	23,2	9	50	22,4	8	58	26,6	8	62	28,4	7	50	22,6	6	53	26,6	11	90	39,2
12	3	54	24,2	1	51	22,8	1	59	27,1	3	65	29,8	4	54	24,4	2	55	27,6	6	96	41,7
13	2	56	25,6	6	57	25,6	1	60	27,5	4	69	31,6	-	54	24,4	10	65	32,6	6	102	44,2
14	6	62	28,3	7	64	28,7	5	65	29,8	8	77	35,3	6	60	27,2	6	71	35,7	7	109	47,4
15	7	69	31,5	6	70	31,4	12	77	35,3	11	88	40,4	12	72	32,6	4	75	37,7	12	121	52,5
16	3	72	32,9	2	72	32,2	3	80	36,7	3	91	41,7	6	78	35,3	7	82	41,2	6	127	55,2
17	4	76	34,7	3	75	33,6	4	84	38,6	3	94	43,1	3	81	36,8	2	84	42,2	6	133	57,8
18	2	78	35,6	4	79	35,4	-	84	38,6	3	97	44,5	3	84	38,1	2	86	43,2	3	136	58,2
19	-	78	35,6	-	79	35,4	2	86	39,4	1	98	45,0	2	86	39,0	-	86	43,2	1	137	59,5
20	1	79	36,1	1	80	35,9	1	87	39,9	2	100	45,9	3	89	40,2	1	87	43,7	2	139	60,5
21	1	80	36,5	1	81	36,6	-	87	39,9	2	102	46,7	-	89	40,2	-	87	43,7	1	140	60,8
22	2	82	37,5	1	82	36,8	-	87	39,9	3	105	48,2	2	91	41,2	-	87	43,7	3	143	62,1
23	2	84	38,4	1	83	37,2	2	89	40,8	-	105	48,2	-	91	41,2	-	87	43,7	2	145	63,0

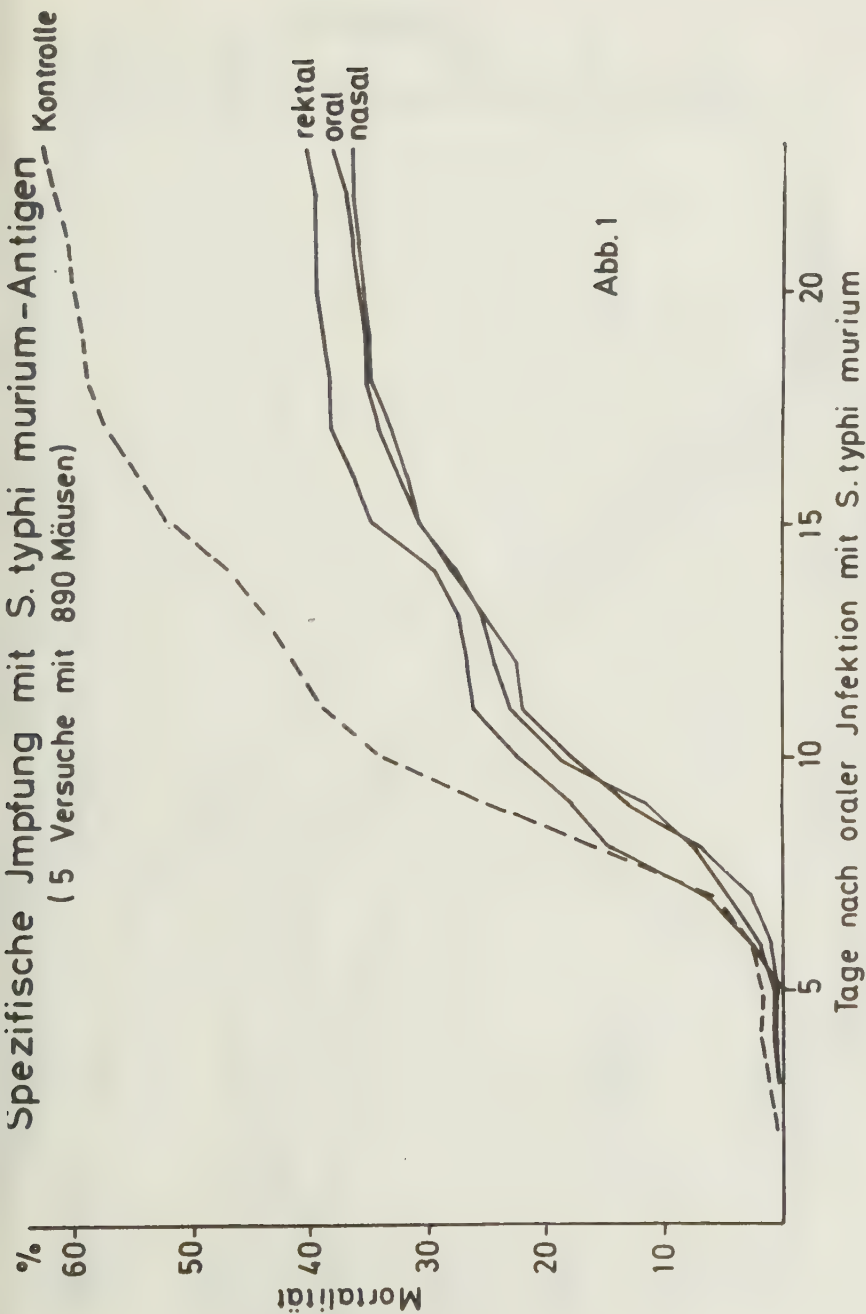
* Tote pro Tag

** Summe der Toten

*** Summe der Mortalität

I

28



Spezifische Impfung mit *S. typhi* murium-Antigen
(5 Versuche mit 876 Mäusen)

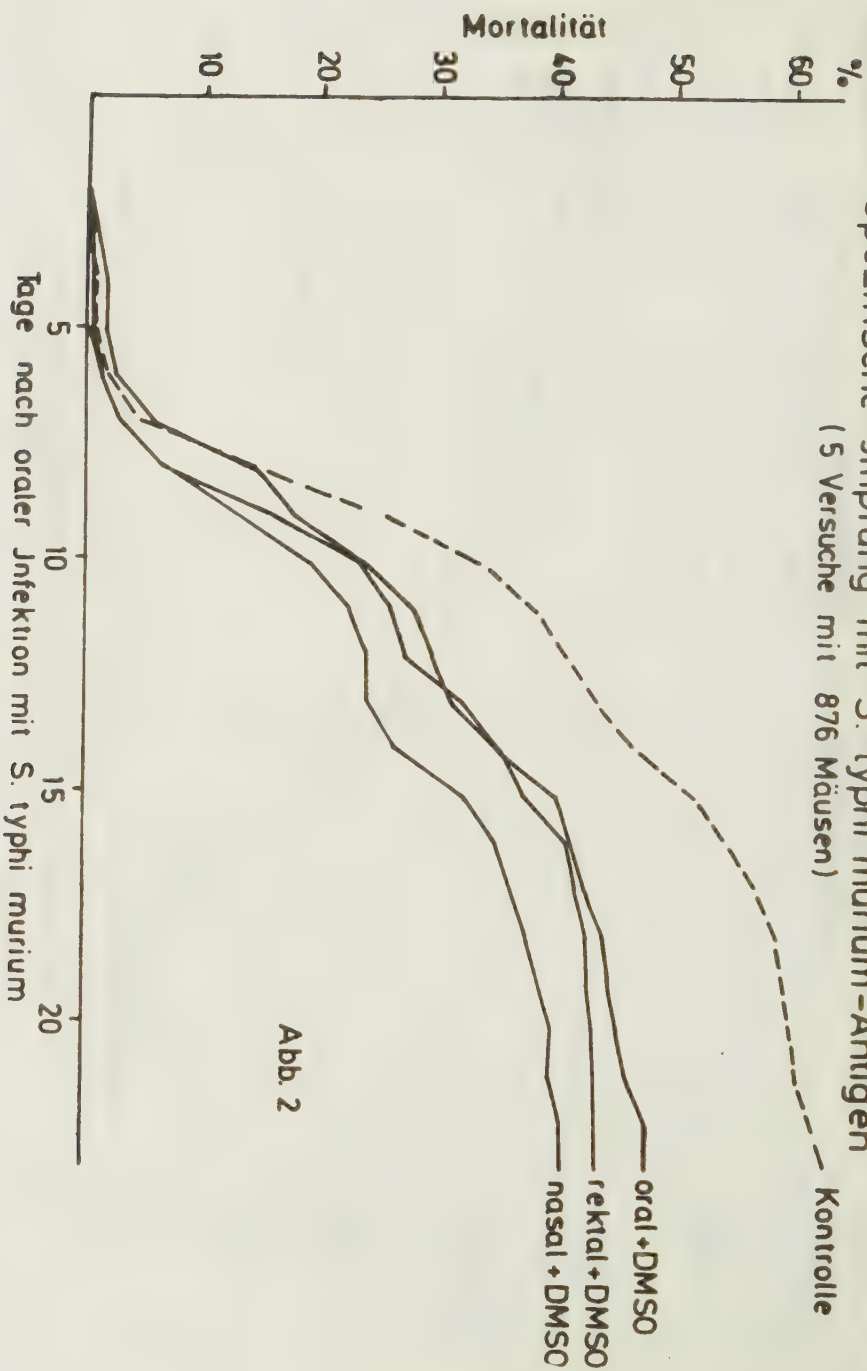


Abb. 2

Spezifische Impfung mit *S. typhi* murium-Antigen (5 Versuche mit 667 Mäusen)

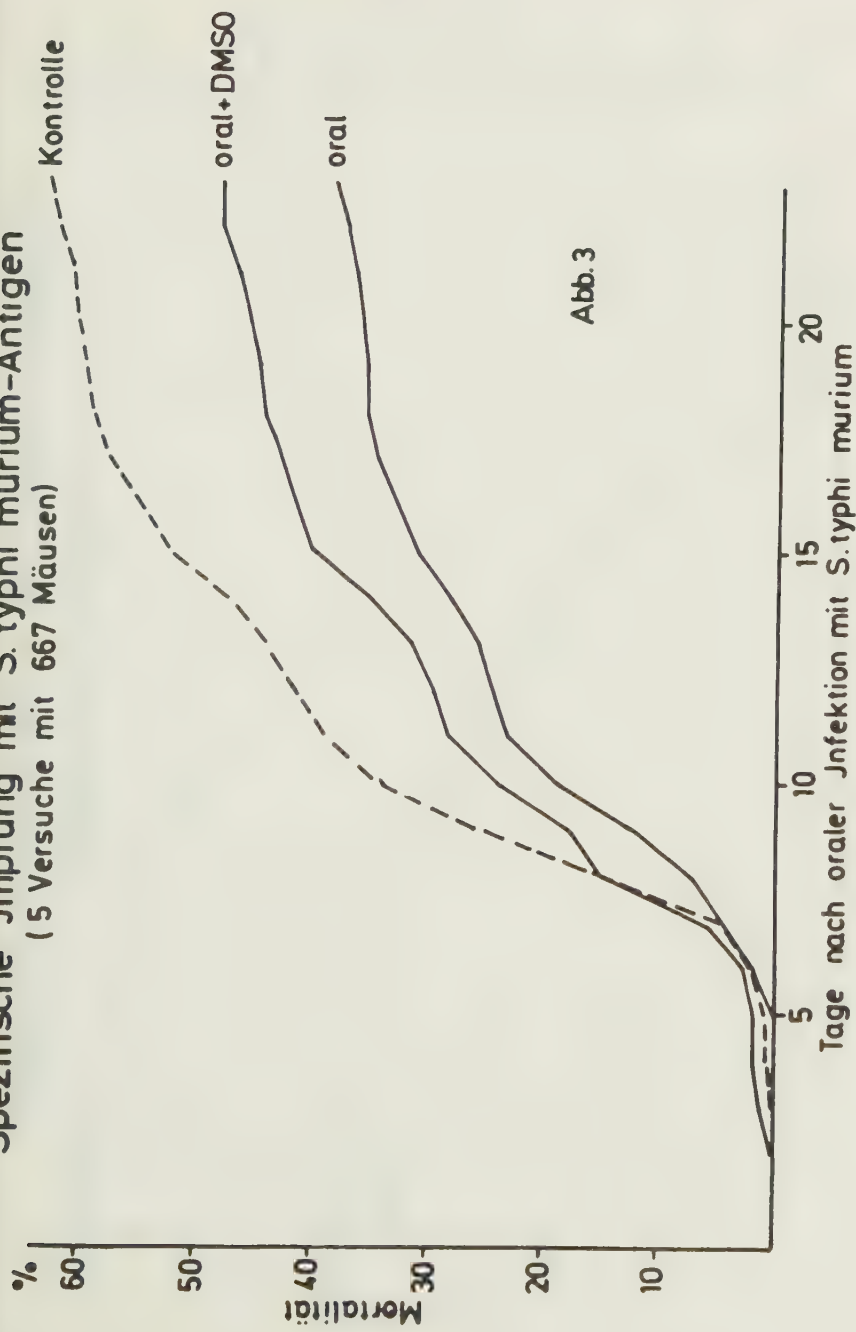


Abb. 3

Spezifische Impfung mit *S. typhi* murium-Antigen (5 Versuche mit 674 Mäusen)

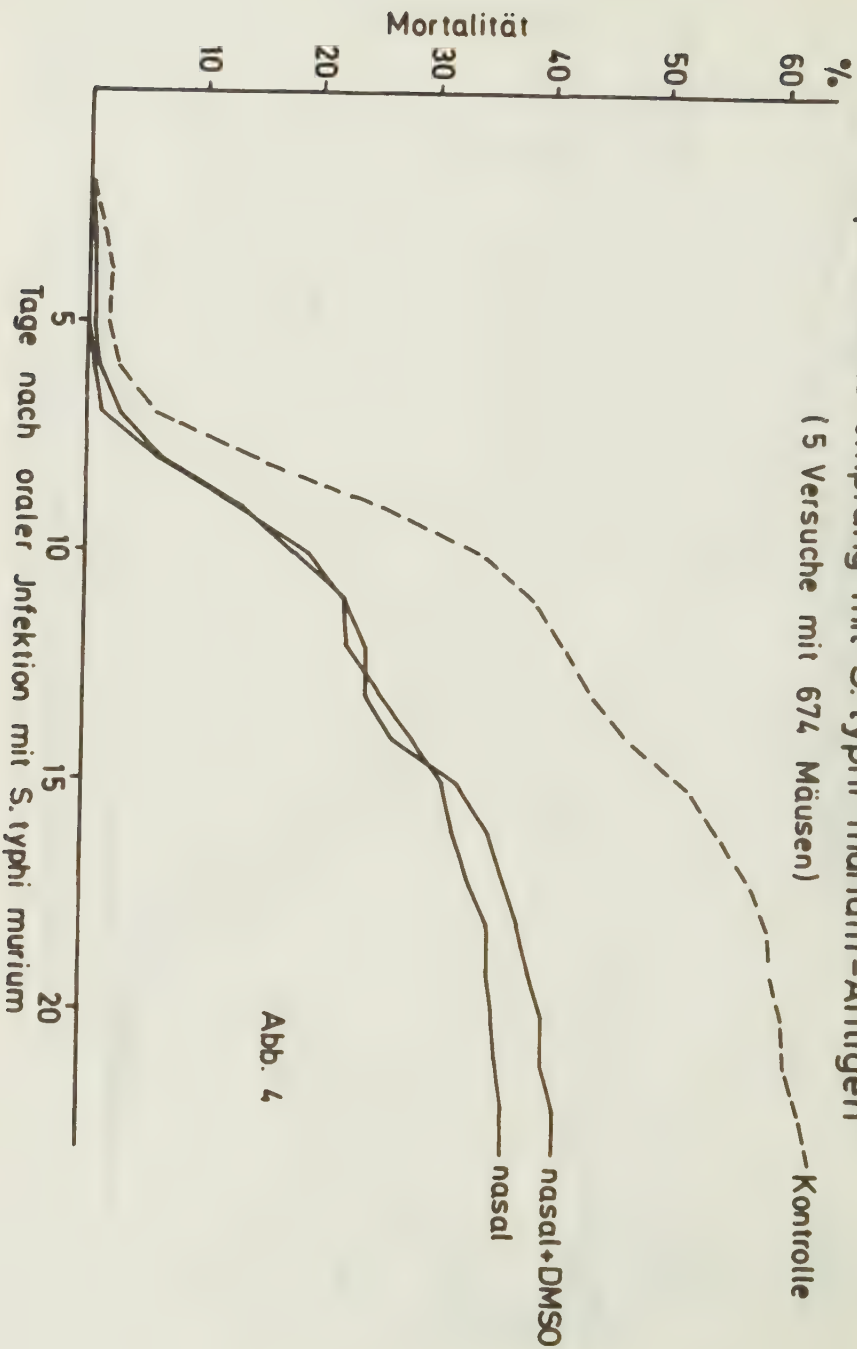


Abb. 4

Spezifische Impfung mit *S. typhi* murium-Antigen
(5 Versuche mit 647 Mäusen)

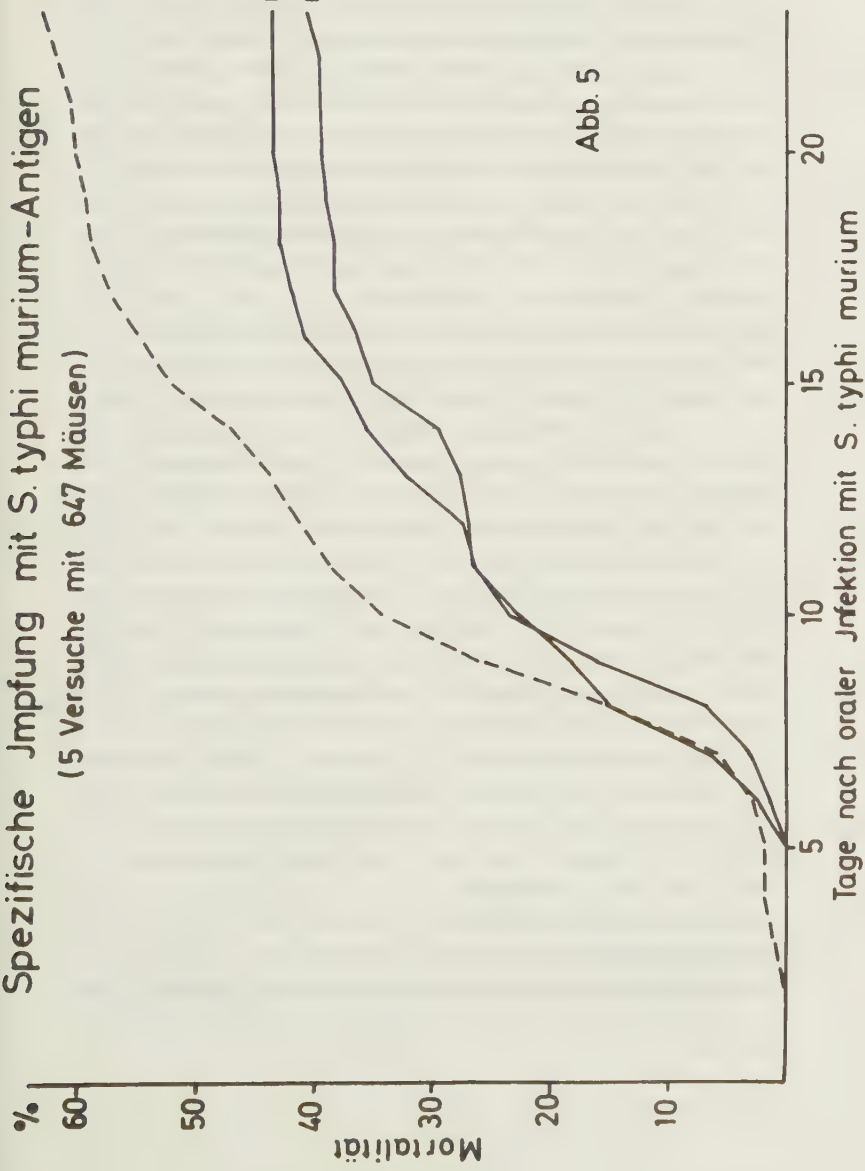


Abb. 5

DISKUSSION

Die graduelle Abhängigkeit des Erfolges einer Immunisierung gegen eine bakterielle Darminfektion vom unterschiedlichen, teils erregerspezifischen Applikationsort der Impfung und vom Zusatz von DMSO zum Impfstoff wurde in parallel laufenden Versuchsreihen gleichzeitig untersucht. Im folgenden werden diese beiden grundsätzlich verschiedenen Wirkungsfaktoren der lokalen Immunisierung, Impfort und DMSO-Impfstoffzubereitung, getrennt nacheinander besprochen.

Im Rahmen des ersten Themenkreises soll zunächst auf die Frage der Gewebsimmunität eingegangen werden. Nach der Theorie der Gewebsimmunität hätte in unseren Versuchen, bei denen ja immer oral infiziert wurde, die orale Immunisierung eindeutig bessere Ergebnisse bringen müssen als die nasale und rektale Methode, bei denen Immunisierung und Infektion auf verschiedenen Wegen erfolgte, und der immunisierende Keim primär andere Zellen berührte als der infizierende Keim. Ein derartiger Unterschied des Wirkungsgrades wurde nicht nachgewiesen: Nach spezifischer, vergleichend oraler, nasaler und rektaler Immunisierung konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Schutzwirkung gegen eine orale Infektion mit *S. typhi* murium beobachtet werden. Alle drei Formen sind in gleichem Ausmaß imstande, die Maus vor der oralen Infektion zu schützen.

Möglicherweise spielen bei diesem Ergebnis technische Gründe eine Rolle: Es war mit den Mäusen als Versuchstieren nicht möglich, den Impfstoff wirklich streng nasal oder rektal zu applizieren.

Ein Teil des nasal verabreichten Impfstoffes wurde verschluckt, ein Teil des rektal gegebenen Impfstoffes wurde aufgeleckt. Bei diesen beiden Methoden spielt also jeweils eine orale Komponente mit. Dabei ist auch in diesen beiden Fällen ein dem Erreger angemessener Weg beschritten worden. Da sich Atem- und Verdauungswege im Schlundgebiet kreuzen, wird eine Luftinfektion auch immer eine Fütterungsinfektion sein. Allerdings meint FICKER (21), daß die Aufnahme versprayerter Keime hauptsächlich durch den Respirationstrakt erfolgt und die Aufnahme über den Digestionstrakt vernachlässigt werden kann.

Der größte Teil des Impfstoffes dürfte auch bei uns auf dem geplanten Wege aufgenommen worden sein, so daß weiterhin die Frage bestehen bleibt, wieso bei der nasalen und rektalen Impfung so relativ gute Ergebnisse erzielt wurden. Bei genauer Betrachtung der Tabellen und Abbildungen ergibt sich sogar ein geringer Vorteil der nasalen Immunisierung gegenüber der oralen, während die rektale Methode am schlechtesten abschneidet. Diese geringfügigen Unterschiede sind vielleicht Ausdruck der unterschiedlichen Resorptionskinetik der Immunogene auf oralem, nasalem und rektalem Wege. Offenbar werden sie über den Respirationstrakt am leichtesten aufgenommen. FICKER (21) weist in einer vergleichenden Betrachtung darauf hin, daß sehr viel geringere Keimmengen genügen, um von den Atemwegen in die Blutbahn zu gelangen als zum Durchtritt durch die Magen-Darmwand nötig sind. IBRAHIM (40) und WALDMANN (90) berichten über einen guten Immunisierungseffekt nasal beziehungsweise tracheal angewandter Antigene im Vergleich zur enteralen Applikation. SANARELLI (76) beobachtete bei einer Inhala-

tionsimpfung mit Meningokokken bei Mensch und Kaninchen sehr hohe Agglutinationstiter, was für die gute Aufnahmebereitschaft des Respirationstraktes für Antigene spricht. HOFFMANN (38) konnte zeigen, daß ein oral, nasal und rektal appliziertes Modellvirus besonders schnell und zuverlässig über den Respirationstrakt aufgenommen wird. Über das Ausmaß der Resorption rektal applizierter Substanzen liegen widersprüchliche Beobachtungen vor. Nach HOFFMANN (38) werden rektal durchschnittlich größere Virusmengen resorbiert als nach oraler Fütterung. KELLER (44) zeigte mit Hilfe des PRAUSNITZ-KÜSTNERschen Versuchs, daß die Permeabilität der Darmwand gesunder Kinder für heterologes unverdautes Eiweiß von Antigencharakter für die einzelnen Darmabschnitte verschieden ist. Bei rektaler Verabreichung eine halbe Stunde nach einem gründlichen Reinigungsklysma waren die Reaktionszeiten am kürzesten vor der duodenalen Applikation und der mit Magensonde. DILLER und BÜNGER (11) untersuchten die Pharmakokinetik der rektalen Applikation an einem wasserlöslichen Pharmakon, das oral vollständig resorbiert wurde. Dagegen wurden rektal bei mehrmaliger Verabreichung kleiner Mengen bestenfalls 79 % aufgenommen. Bei Gabe der Gesamttagesdosis auf einmal wurden oral noch etwa 90 %, rektal aber trotz längerer Stuhlentleerungspause nach der Behandlung nur etwa 50 % aufgenommen. Bei unseren Versuchen, in denen wir die Stuhlentleerungen nicht beeinflussen konnten, dürfte trotz gleich hoher Dosierung rektal weniger Substanz aufgenommen worden sein als oral. Unseren Impfergebnissen zufolge werden die inaktivierten Bakterien am leichtesten über den Respirationstrakt aufgenommen; die orale und

rektale Resorption sind jeweils etwas geringer.

Das gute Abschneiden der nasalen Immunisierung wird vielleicht auch erklärlich, wenn man die besondere Sekretionsleistung des Lungenepithels im von RAETTIG (70) postulierten Kreislauf der Antigene berücksichtigt. Aufbauend auf Versuchen von MEWES (57) mit radiomarkiertem bakteriellem Antigen kommt RAETTIG zu folgender in diesem Zusammenhang wichtigen Aussage über den Verbleib des Antigens im Organismus: Jedes Antigen kann im Körper verschiedene Wege gehen, die alle über das strömende Blut führen. Ein Teil des Antigens wird sofort mit Urin und Kot ausgeschieden und geht damit weitgehend immunisatorisch verloren. Ein zweiter Teil wird gleich in den Zellen der biologischen Abwehr abgefangen und spezifisch verarbeitet. Ein dritter Teil des Antigens wird in den oberen Luftwegen ausgeschieden und auf enteralem Wege erneut aufgenommen. Der so entstehende Kreislauf des Antigens ist unabhängig vom primären Ort der Antigenezufuhr. Der Kontakt des Antigens ist also mit den Schleimhäuten der Atemwege durch die Sekretionsleistung und mit den Schleimhäuten des Magen-Darmkanals durch ständige Wiederaufnahme besonders innig.

Die vorliegenden Versuche scheinen zu bestätigen, daß der Ort der Antigenaufnahme für den Wirkungsgrad der Impfung unwesentlich ist. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß streng lokalisierte Abwehrmaßnahmen des Makroorganismus entscheidenden Anteil an der zustandegekommenen und statistisch signifikanten Immunität haben könnten.

Die körpereigene Abwehr - auf welchem Wege auch immer erworben - ist nach heutigen Vorstellungen

(39, 30) ein komplexer Vorgang, an dem sich spezifische und unspezifische Faktoren beteiligen. Einerseits sind dies die Immunantikörper, andererseits die Phagozyten sowie gewisse humorale Faktoren (zum Beispiel Properdin, Opsonin, Komplement, Interferon), Zell- und Gewebslysine und die Polyelektrolyte der Grenzflächen. Unter Immunogenität eines infektiösen Agens verstehen wir die Eigenschaft, die Summe aller spezifischen und unspezifischen Abwehrsysteme herauszufordern; die Antigenität bezieht sich allein auf die spezifische Antikörperbildung. Die Immunität eines Organismus muß nicht zwangsläufig nur auf seinen Antikörpern beruhen.

Die humoralen und zellulären Mechanismen stehen in enger Wechselwirkung zueinander. Das wird zum Beispiel deutlich an der Opsoninwirkung: Opsonine werden an Bakterien oder Zellgrenzflächen adsorbiert und erlauben so eine bessere Haftfähigkeit für die Phagozyten. Auch die Bildung der Antikörper ist letzten Endes eine zelluläre Leistung: Das reticuloendotheliale System, die Lymphozyten oder die Plasmazellen werden als zelluläre Bildungsstätten der Antikörper diskutiert. EHRICH (14) sieht in der von ihm entwickelten sogenannten "genetischen" Theorie alle drei Elemente bei der Antikörperbildung beteiligt. Die korpuskulären Antigene sollen demnach in den reticuloendothelialen Zellen zu effektiven Molekülen degradiert werden. Nachdem diese in die Gewebsflüssigkeit, Lymph- oder Blutbahn abgegeben wurden, stimulieren sie direkt oder indirekt das indifferenzierte Mesenchym, Plasmazellen zu bilden. Die Plasmazellen erzeugen dann während der Reifung in ihrem Cytoplasma, ähnlich wie die

Erythrozyten das Hämoglobin, die gegen das Antigen gerichteten spezifischen Antikörper. Die Lymphozyten sollen durch die Bildung eines notwendigen Kofaktors an der Antikörperbildung mitbeteiligt sein. Die Frage, ob die Bildung zellständiger Antikörper, einen Schritt in der Bildung humoraler Antikörper darstellt, oder ob es sich dabei um eine primitive Form der Immunität handelt oder ob sie von der Bildung humoraler Antikörper grundverschieden ist, läßt sich heute noch nicht sicher entscheiden (15).

Neben den sehr spezifisch wirkenden Antikörpern spielt bei der Abwehr besonders der Salmonellen noch der unspezifische Serumfaktor Properdin eine große Rolle. Dieses hat eine große Affinität zu den endotoxischen Lipopolysacchariden dieser Keime und bildet mit ihnen Komplexe, wodurch die Lyse des Mikroorganismus eingeleitet wird.

Einzelne Abwehrsysteme scheinen auch in den Geweben lokalisiert zu sein. KAHN (43) konnte an dreizehn verschiedenen Gewebearten nachweisen, daß dort neben Antikörpern und Phagozyten eine weitere Abwehrkraft bestehen müsse. Diese Kraft war in der Haut am stärksten ausgeprägt. Möglicherweise handelt es sich dabei um die antitoxische Wirksamkeit der Polyelektrolyte der Körperoberflächen, die von VOSS (89) näher untersucht worden sind. Danach sind die Mucopolysaccharide Chondroitinsulfat, Heparitinsulfat und Heparin, die besonders reichlich in der Haut und den Schleimhäuten auftreten, infolge ihrer hohen Ladungsdichte geeignet, Proteine, zum Beispiel auch Toxine und Antigene sowie infektiöse Agentien an sich zu ketten, was eine allererste Abwehrmaßnahme darstelle. Diese Abwehr könnte trainiert werden und auch die spezi-

fische Antikörperabwehr entlasten. So ist beobachtet worden, daß bei Agammaglobulinämie der Organismus versucht, durch Vermehrung und Funktionssteigerung der Mucopolysaccharide zu einer Bindung und Unschädlichmachung von Fremdstoffen zu gelangen, was ihm im Falle der bakteriellen Endotoxine und Viren auch weitgehend gelingen soll.

Wieweit die lokale Immunisierung im einzelnen auf den beschriebenen Abwehrmechanismen beruht, ist unklar. Möglicherweise unterscheiden sich die subkutanen und lokalen Typhusimpfungen nur darin, daß sie die verschiedenen Abwehrmöglichkeiten in unterschiedlichem Ausmaß in Gang setzen. Manches spricht dafür, daß die relative Unspezifität der lokalen Immunisierungen (71 a) auf der besonderen Ausnutzung der unspezifischen Abwehr beruht. Auf die Bedeutung des Properdins bei Salmonellosen ist schon hingewiesen worden. Auch das Interferon spielt bei der Abwehr von Salmonellen eine Rolle, wie STINEBRING und YOUNGNER (82) in Tierversuchen nachweisen konnten. Ob diese Substanzen bei lokaler Immunisierung auch lokal besonders angereichert werden, ist meines Wissens noch nicht untersucht worden. Für Opsonin ist aber gerade diese Frage durch Tierversuche von TORIKATA und IMAIZUMI (84) bejaht worden. Sie stellten als Unterschied zwischen der Injektions- und der oralen Immunisierung fest, daß einerseits die Preßsäfte der Dünn- beziehungsweise Dickdarmwand nach oraler Immunisierung beträchtlich größere Mengen Opsonin als die Blutsera enthielten und andererseits bei subkutaner Injektionsimmunisierung im Blutserum mehr Opsonin nachweisbar ist als in den Darmwandpreßsäften. Sie schließen daraus, daß durch die Injektionsimmunisierung vor allem die

Serumimmunität und durch die orale Immunisierung in erster Linie die lokale Gewebsimmunität ausgelöst wird. Die spezifischen Antikörper betreffend muß noch einmal festgestellt werden, daß alle Antikörper zunächst zellulär gebildet werden, und zwar sowohl bei parenteraler als auch bei lokaler Immunisierung in den regionalen immunkompetenten Zellen; bei der üblichen subkutanen Impfung am Arm also in den Achsellymphknoten, bei der oralen Impfung in den Peyerschen Plaques des Dünndarms. Jeweils am Ort des Erregereintritts dürften sich Plasmazellen ansammeln. Als Beweis dazu können die Versuche von VAN DE LOO (53) herangezogen werden. Er untersuchte die Lokalisation der Antikörperbildung nach aerogener Immunisierung und konnte eine deutliche Plasmazellenvermehrung in der Submucosa der Bronchialschleimhaut beobachten, was ja auf Antikörperbildung hinweist. Das weitere Schicksal der neugebildeten Antikörper dürfte etwas unterschiedlich sein, je nachdem, ob parenteral oder lokal immunisiert wurde. Ein Teil der Antikörper bleibt in jedem Falle zellständig. Der andere Teil wird nach "außen" abgegeben; das heißt, bei parenteraler Impfung in die Gewebsflüssigkeit und das Blut, bei der lokalen Immunisierung aber größtenteils an die entsprechenden Körperoberflächen, zum Beispiel in das Darmlumen.

Diese Antikörper im Darminhalt - der Darmflüssigkeit oder den Fäces - sind als Koproantikörper definiert worden. Sie spielen sicher eine bedeutende Rolle bei der oralen Immunisierung. KOSHLAND und BURROWS (50) konnten zeigen, daß Serum- und Koproantikörper unabhängig voneinander gebildet werden und daß der Titer der Koproantikörper schneller an-

steigt und eher wieder abfällt als der Titer der Serumantikörper. Die ersteren entstehen also nicht durch einfachen Übertritt von Serumantikörpern aus dem Blut in das Darmlumen. RAUSS und KETYI (74) konnten diese Beobachtung später bestätigen. FRETER (27) hat sich der Erforschung der Koproantikörper besonders gewidmet. Am Modell einer Chole-
rainfektion des Meerschweinchens konnte er nachweisen, daß der Koproantikörpertiter und nicht der Serumantikörpertiter ein Gradmesser für die belastbare Immunität ist. In Freiwilligenversuchen mit menschlicher Cholera konnte er feststellen, daß Koproantikörper nach oraler Immunisierung regelmäßig bei mindestens 77 % der Untersuchten deutlich meßbar ansteigen. Diese Kontrollierbarkeit des Imperfolges erscheint für Routineuntersuchungen ausreichend. Nach Versuchen von FRETER und GRANOSA (28) ist die Fähigkeit Koproantikörper zu bilden, sämtlichen, auch den untersten Darmabschnitten eigen. Theoretisch wäre es auch durchaus denkbar, daß Koproantikörper aus dem Respirationstrakt stammen. Nach aerogener Immunisierung könnten die regional gebildeten Antikörper in die freien Atemwege abgegeben werden, dann verschluckt werden und schließlich als Koproantikörper imponieren. Absonderungen aus dem Respirationstrakt gehen sehr häufig diesen Weg; so ist die Untersuchung des Magensaftes auf Tuberkelbakterien zur Routineuntersuchung in der Diagnostik der Lungentuberkulose geworden.

Aus diesem Grunde erscheint die in den vorliegenden Versuchen angewandte Methode der vergleichenden oralen, nasalen und rektalen Immunisierung zur Klärung der Frage, ob das lokal beimpfte Gewebe eine eigene Abwehr ausbildet, unzureichend. Eine Abgrenzung der durch den Atemtrakt erfolgten Immunreaktionen von

denen des Magen-Darmkanals ist wegen der offenen Verbindung beider Traktus nahezu unmöglich. Zweckmäßiger wäre sicher die vergleichende Immunisierung über zwei wirklich voneinander unabhängige Organsysteme; zum Beispiel Magen-Darmkanal/Vagina oder Magen-Darmkanal/Harnblase. Mögliche gleichartige Ergebnisse ließen sich dann nur durch Vermittlung des Blutes zwischen den Organsystemen erklären, wie es in der Annahme eines Kreislaufs der Antigene und auch der Antikörper angedeutet ist.

Zusammenfassend ist zu bemerken, daß parenterale und lokale Impfungen prinzipiell gleiche Abwehrmechanismen in Gang zu setzen scheinen. Das Ausmaß unspezifischer Reaktionen dürfte bei lokaler Immunisierung allerdings größer sein als bei parenteraler; beweisend dafür scheint die stärkere Unspezifität der lokalen Immunisierung. Die Unterschiede in der Antikörperbildung dürften abhängig sein von den andersartigen Resorptionsorten und -bedingungen für das Antigen. Bei parenteraler Immunisierung wird das Antigen langsam, möglichst aus einem Depot, resorbiert und fortlaufend in den regionalen antikörperkompetenten Zellen verarbeitet; die Antikörper werden über entsprechend lange Zeit hin an das Blut abgegeben. Der Kontakt des lokal, beispielsweise oral verabfolgten Antigens mit dem Gewebe ist naturgemäß sehr viel kurzdauernder; die Antikörper, oberflächennah gebildet, werden an die Körperoberflächen abgegeben, zum Beispiel als Koproantikörper, die lokal wirksam sind. Diese Deutung der Geschehnisse schließt keinesfalls die Bildung von Koproantikörpern nach parenteraler oder die Bildung von Serumantikörpern nach oraler

Immunisierung durch besonders starke Antigenreize aus. In diesem Sinne wirkt die orale Immunisierung auch trainierend auf die Bildung humoraler Antikörper. Nach der ersten Immunisierung dürften zunächst fast nur Koproantikörper entstehen, bei darauffolgender Infektion sind als Boosterwirkung auch hohe Mengen von Serumantikörpern nachweisbar. LIETZ und RAETTIG (52) haben diese These auch in Tierversuchen bestätigt gefunden. Entscheidend für den Grad des spezifischen Schutzes ist nicht die Höhe des Antikörpertiters im strömenden Blut zur Zeit der Infektion, sondern die Bereitschaft der immunkompetenten Zellen, im Bedarfsfall schnell Antikörper zu bilden. Diese Bereitschaft kann durch orale Immunisierung erworben werden.

Die lokale Immunisierung gegen bakterielle Darminfektionen hat gegenüber der subkutanen Impfung viele praktische Vorteile. Sie wird aber erst dann wirklich konkurrenzfähig, wenn vorher sichere Aussagen über ihre Erfolge zu machen sind, also eine Wertigkeitsprüfung der Impfstoffe möglich ist. Entsprechende Versuche, zum Beispiel zur Erfassung der Gesetzmäßigkeit der Antikörperbildung nach lokaler Immunisierung - Messung ihrer Titer im Darminhalt, ihr Anstieg nach Infektion im Serum - sind im Gange (74, 52).

DMSO als Adjuvans zur lokalen Immunisierung hat sich in der beschriebenen Versuchsanordnung nicht bewährt. Alle DMSO-Impfungen zeitigten schlechtere Ergebnisse als die einfachen üblichen Impfungen. Wenn auch die Unterschiede zwischen den Mortalitätsziffern nicht statistisch signifikant sind, so spricht doch der übereinstimmende Befund in allen Versuchen dafür, daß keine zufälligen Abweichungen

vorliegen. Als Ursache für diesen Mißerfolg kommen verschiedene Gründe in Frage.

Zunächst dürfte es zweckmäßig sein, die Voraussetzung für den erwarteten besseren Impferfolg, nämlich die penetrationsvermittelnde Eigenschaft des DMSO, kritisch zu überprüfen. Bisher wurde ausschließlich über Penetrationssteigerung von chemisch reinen und verhältnismäßig kleinmolekularen Stoffen, allerdings von chemisch sehr unterschiedlicher Struktur, berichtet. So wurde bewiesen, daß DMSO die Resorption von zum Beispiel Heparin, Natriumsulfat, Evans Blue, Sulfadiazin, Aminophyllin, Triäthylthiophosphoramid (41), Paraaminohippursäure (34), Glukose und Galaktose (8) über verschiedene Schleimhäute teilweise erheblich steigert. Durch die Haut vermittelte DMSO die Resorption von Hexopyrroniumbromid, Naphazolinhydrochlorid, Fluocinolonacetonid, Hexopyrroniumchlorid, Hydrocortison (83) und verschiedener teils sedierender, teils erregender Psychopharmaka wie d-Tubocourarin, Thiopental und Amphetamin (39). Es wurden zu diesen Versuchen 2- bis 50%-ige DMSO-Lösungen benutzt, dabei wurden teils mit den höheren (83), teils mit den niedrigeren (8) Konzentrationen die besseren Ergebnisse erzielt. Die Untersuchungen DIXONS (12), die den bisher zitierten Berichten größtenteils widersprechen, sollen hier unberücksichtigt bleiben, weil dort eine schwer vergleichbare und anfechtbare Methode benutzt wurde.

Der Wirkungsmechanismus der Penetrationsvermittlung ist weitgehend ungeklärt; es werden chemische und mechanische Möglichkeiten diskutiert. Chemisch könnte DMSO wirken als Lösungsmittel oder als Carrier-Substanz (12), mechanisch im Sinne einer Struktur-

änderung des Gewebes (61, 66). MONTES und Mitarbeiter (61) wiesen eine Modifikation des Stratum corneum der Haut nach, die vielleicht in einer Lösung des Keratingehalts der Zellen besteht. PUIG-MUSET und MARTIN-ESTEWE (66) beschrieben die Änderung der cis-cis-Struktur der ungesättigten Fettsäuren der Zellwand, was die Bildung einer Pore bedingt. Es wäre denkbar, daß diese Änderungen gerade ausreichen, um kleinmolekularen Substanzen rein mechanisch die Penetration zu ermöglichen, daß aber größermolekulare Stoffe weiterhin zurückgehalten werden. Bei Annahme eines chemischen Wirkungsmechanismus ist es klar, daß die Wirkung sich auf bestimmte chemische Strukturen beschränkt und es sicherlich nicht zulässig ist, allzu großzügig zu verallgemeinern. Über die Überlegung, daß die Resorption großkorpuskulärer und chemisch uneinheitlicher Substanzen wie inaktivierte Bakterien durch DMSO wahrscheinlich nicht begünstigt wird und also DMSO bei unserer Immunisierung kaum adjuvierend wirken dürfte, führt ein Bericht von SPENCER und VISHNO (80) sogar noch hinaus. Sie untersuchten DMSO hinsichtlich einer Steigerung der intestinalen Resorption von Nahrungsmitteln in der Hoffnung auf ein neues Therapeuticum für das Malabsorptionssyndrom. Auch sie wurden in ihren Erwartungen enttäuscht. Ihre in vitro-Versuche ergaben, daß DMSO den normalen Aminosäuretransport durch die Dünndarmwand hemmt. Diese Hemmung war proportional der DMSO-Konzentration: Beginn der Hemmwirkung bei einer Konzentration von 2,3 % oder 0,3 M bis zu kompletter Hemmung bei einer Konzentration von 7,8 % oder 1 M. Es wäre also durchaus möglich, daß in unseren Versuchen DMSO die Resorption der Immunogene nicht nur

nicht verbessert, sondern sogar verringert. Bei Annahme bloß fehlender Penetrationsvermittlung wird immerhin schon erklärlich, daß die DMSO-Impfungen keine Verbesserung der Impfergebnisse gebracht haben. Zur Klärung der Frage, weshalb eine Verschlechterung eintrat, können noch andere Gründe herangezogen werden.

Im Verlauf unserer Versuche mußten wir verschiedentlich unerwünschte Nebenwirkungen beobachten, wie Gedeihstörungen und Schleimhautblutungen. Es ist also naheliegend, die Schädigung des Makroorganismus durch DMSO mit Beeinträchtigung der Abwehrlage als Ursache für die schlechten Ergebnisse der DMSO-Impfungen zu erwägen. Zur genauen Analyse der Vorgänge empfiehlt es sich zu unterscheiden zwischen der allgemeinen Toxizität für den Gesamtorganismus, der spezifischen Toxizität für einzelne Organsysteme und der lokalen Toxizität für die Applikationsorte.

Die LD_{50} für das unverdünnte DMSO liegt bei oraler Verabreichung an die Maus zwischen 15,0 und 19,5 ml pro kg Körpergewicht oder 16,5 und 21,4 pro kg Körpergewicht (35). Mit Wasser verdünntes DMSO hat gegenüber der konzentrierten Substanz eine etwas geringere allgemeine Giftigkeit: 33%-ige Verdünnungen haben eine LD_{50} von 17,0 ml pro kg Körpergewicht (79). Die von uns verabreichten Einzeldosen von 13,8 ml 30%-iges DMSO (oral), 5,5 ml 90%-iges DMSO (nasal) und 5,5 ml 30%-iges DMSO (rektal) entsprechen also einem Drittel bis Dreiviertel der LD_{50} . Bei täglicher Verabreichung entsprechender Mengen an Ratten beobachteten sowohl SOMMER und TAUBERGER (79) als auch GÜNZEL und RICHTER (35) vereinzelt Todesfälle und generell eine Verminderung der Gewichtszunahme. Zu diesen Symptomen herabgesetzter Vitalität, die wir mit unseren Versuchen nur bestätigen

können, würde durchaus eine Minderung der Abwehrkraft passen. Der durch DMSO geschwächte Organismus vermag den Immunogen-Reiz nicht mehr normal zu beantworten; das Versuchstier ist vor der Infektion weniger geschützt. Der höchsten DMSO-Dosierung bei unserer oralen DMSO-Impfung entspricht der im Verhältnis zur üblichen Impfung höchste Wirkungsgradverlust von 15,4. Es folgen die nasale Impfung mit 6,9 und die rektale Impfung mit 5,0 Wirkungsgradverlust, was sehr deutlich die teils größeren, teils kleineren Unterschiede in der DMSO-Dosierung widerspiegelt.

Man fragt sich, ob und in welchem Maße die spezielle Schädigung einzelner Organsysteme für dieses Endergebnis ausschlaggebend ist. In unserem Zusammenhang interessiert vor allem die Wirkung des DMSO auf die Gewebe der Infektionsabwehr. Werden durch das DMSO die Immunreaktionen der Tiere während der Impfung gestört? In den Berichten über Untersuchungen von Toxizität und Nebenwirkungen finden sich keine entsprechenden Hinweise. GÜNZEL und RICHTER (35) betonen ausdrücklich, daß hämatologische Untersuchungen an Hunden, die längere Zeit mit DMSO behandelt worden waren, keinen pathologischen Befund erbrachten. Bei Ratten sahen dieselben Autoren eine Abnahme der Leukozytenzahl und eine Verschiebung des Verhältnisses von Granulozyten zu Lymphozyten zugunsten der ersteren. TSCHÖPE (zitiert nach 72) hat in Kaninchenversuchen mit *S. typhi* murium und DMSO die Wirkung des DMSO auf die Immunreaktion der Tiere genauer untersucht. Mit den DMSO-Impfstoffzubereitungen waren sowohl die Antikörperbildung besser als auch im Infektionsbelastungsversuch (Kutan) die Krankheitszeichen gemildert; das

Fieber war niedriger, die Entzündung weniger ausgedehnt. DMSO wirkt also wahrscheinlich nicht speziell schädigend auf das körpereigene System der Infektionsabwehr.

Die Systemtoxizität wird allgemein als gering bezeichnet, es wird aber immer wieder betont, daß DMSO in hohen Konzentrationen lokale toxische Schäden hervorruft. DMSO entzieht dem Gewebe Wasser und schädigt es dadurch. So kann es zur Destruktion des Gewebes und Schleimhautblutungen kommen. Mit abnehmender DMSO-Konzentration nimmt auch deutlich die lokale Reizwirkung ab, während die LD_{50} der Verdünnung kaum geringer als die der konzentrierten Substanz ist (79). Erste Anzeichen toxischer Beeinflussung der Schleimhaut konnten in vitro schon bei Konzentrationen von 2,3 % nachgewiesen werden (80), für die Darmschleimhaut in vivo dürfte der Wert natürlich höher liegen. BUBLITZ und GRIES (4) beschrieben außerdem die Lösung von Mucopolysacchariden, die wahrscheinlich ein Faktor der lokalen Infektabwehr sind (89), aus dem Gewebsverband durch hochkonzentrierte DMSO-Lösungen. Es erscheint danach als möglich, daß eine mit DMSO behandelte Schleimhaut dem Eindringen von Keimen einen geringeren Widerstand entgegensetzt.

RAETTIG (72) hat diese Theorie in Mäuseversuchen überprüft. Er verfütterte verschieden konzentrierte DMSO-Lösungen (22,5 %, 30 % und 45 %) in demselben Rhythmus und mit derselben Dosis wie bei der oralen Impfung. Die Tiere wurden zehn Tage nach der letzten DMSO-Gabe wie nach einer Impfung oral mit virulenten *S. typhi murium*-Bakterien infiziert. Überraschenderweise war die Infektionssterblichkeit der mit DMSO behandelten Tiere geringer als die der unbehandelten Kontrolltiere. Die dem DMSO ausgesetzte

Schleimhaut ist also nicht besonders schutzlos. Dabei ist noch besonders bemerkenswert, daß die Tiere, die mit den höher konzentrierten Lösungen behandelt worden waren, deutlich besser abschnitten als die Tiere, denen die 22%-ige Lösung verabreicht worden war. Es müssen also noch andere Gründe als die dosisabhängige Unverträglichkeit des DMSO für die schlechten Ergebnisse mit den DMSO-Impfstoffen verantwortlich sein.

Bei Vergleich der DMSO-Immunogen-Impfungen und der bloßen Anwendung von DMSO fiel es RAETTIG (72) auf, daß in beiden Fällen der Impfschutz etwa gleich groß war. Er zog daraus den Schluß, daß dieser Impfschutz in beiden Fällen auf einer DMSO-Wirkung beruht und daß das Immunogen in dem einen Falle überhaupt nicht gewirkt hat. Er postulierte daraufhin, daß DMSO eine Schädigung des Mikroorganismus mit Zerstörung seiner immunogenetischen Eigenschaften verursacht. Diese Annahme konnte durch genaue Beobachtung der Zubereitung des DMSO-Impfstoffes bestätigt werden.

Diese Wirkung läßt sich mit den Lösungsmiteleeigenschaften des DMSO erklären. Bestimmte Zellwandbestandteile der Bakterien werden durch DMSO gelöst. Sehr deutlich wird das an verschiedenen neuen Färbemethoden von Mikroorganismen mit DMSO. MITCHELL (58) beschreibt Versuche, die Färbung von Darmparasiten zu vereinfachen mit DMSO als Trägersubstanz des Farbstoffes, was auch ausgezeichnet gelang. MUFTIC (63) färbte säurefeste Mycobakterien mit Karbol-fuchsin mittels DMSO. Er führt den Erfolg darauf zurück, daß Auskleidungen von Zellwandporen aus Polysacchariden gelöst werden, und so der Weg für den Farbstoff in das Innere der Zelle frei wird. Die wirksamen Antigene der gramnegativen Darmbakte-

rien sind als Endotoxine eng an gewisse Strukturen der Zellwand gekoppelt. Es handelt sich um relativ hitzestabile Lipopolysaccharide, die bei Autolyse der Bakterien in die Umgebung freigesetzt werden. Bei unserer DMSO-Impfstoffzubereitung mit langdauernder Einwirkung des DMSO auf die inaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien hat DMSO diese Lipopolysaccharide sicher aus der Zellwand herausgelöst. Diese DMSO-Lösung ist sicher nicht mehr antigen wirksam.

Auch ADAMS (1) beschreibt das DMSO als sehr gutes Extraktionsmittel für Lipopolysaccharide aus gram-negativen Bakterien. Er äußert sich jedoch nicht über das Antigenverhalten des Extraktes. GEHRING (32) dagegen konnte nachweisen, daß in DMSO sowohl typen- als auch gruppenspezifische Streptokokken-Polysaccharide in Lösung gehen, die serologisch determinanten Bereiche im Polysaccharid-Molekül dabei erhalten bleiben und im Immunodiffusionstest mit dem homologen Antiserum zu erfassen sind; der Nachweis der im DMSO gelösten antigen wirksamen Polysaccharide gelingt jedoch nicht im Röhrchen-Präzipitationstest. ORMSBEE und Mitarbeiter (64) schließlich extrahierten Antigene zweier verschiedener *Coxiella burneti*-Stämme mit DMSO; der Extrakt des Stammes Ohio 314/Phase I war antigen-wirksam im Gegensatz zum Extrakt des verwandten Stammes Nine Mile/Phase II. Eine Regel für das Verhalten von mit DMSO behandelten Antigenen läßt sich also nicht aufstellen. Die Antigenität von *S. typhi murium* wird aber offenbar zerstört.

Abschließend stellt sich nur noch die Frage, wie nach alledem DMSO-Impfstoffzubereitungen die weiße Maus überhaupt vor der Infektion in statistisch signifikantem Maße schützen können. Möglicherweise

ist dies die positive Kehrseite der bereits beschriebenen lokalen Reizwirkung und der schädlichen Wirkung für Mikroorganismen. Sowohl KRIZEK und DAVIS (51) als auch TSUCHIYA und Mitarbeiter (86) berichten über antibakterielle und antifungizide Eigenschaften des DMSO. *E. coli* wächst nicht in Nährbouillon, die mit über 33%-igem DMSO versetzt wurde, während in Kontrollbouillon ein Wachstum von 10^8 Keime pro ml zu beobachten ist. WALSER (91) allerdings konnte keine Wachstumshemmung durch Kuhmilch, die durch die Euterhaut penetriertes DMSO enthielt, feststellen. Wahrscheinlich waren hier aber auch die DMSO-Wirkungskonzentration zu gering. In unseren Versuchen wäre die Voraussetzung für eine antibakterielle Wirksamkeit am Tage der Infektion der Verbleib von antibakteriell wirksamen Mengen DMSO über einen Zeitraum von mindestens zehn Tagen. Da dies aber den Tatsachen der DMSO-Verteilung im Organismus und der DMSO-Ausscheidung widerspricht (47), entfällt diese Möglichkeit.

Zur Erklärung des statistisch signifikanten Impfschutzes durch DMSO-Impfstoffzubereitungen in unseren Versuchen bleibt nur der Hinweis auf die unspezifische Schädigung der Schleimhaut. DMSO in genügend hoher Konzentration ruft eine örtliche akute Entzündung hervor, die nach ihrem Abklingen eine unspezifische Immunität hinterläßt. Die hierfür günstigste Konzentration liegt zwischen 30 % und 45 %; geringere (5 %, 22 %) werden reaktionslos vertragen, höhere verursachen schwere bis tödliche Schäden.

Zur Verbesserung der lokalen Immunisierung erwies sich DMSO als ungeeignet. In der Bakteriologie wird es aber wahrscheinlich als antimikrobielles und des-

infizierendes Mittel an Bedeutung gewinnen.

Ob sich unsere Absicht mit einer anderen Substanz verwirklichen läßt, ist fraglich. Man wird bei derartigen Versuchen immer mit der Schwierigkeit zu rechnen haben, daß eine Substanz, die die Schleimhaut durchlässiger macht - was die lokale Immunisierung sicherlich fördert - , auch schwere Schleimhautschäden verursacht und außerdem die immunogenetischen Eigenschaften des Impfstoffes beeinträchtigt.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der Grundlagenforschung zur lokalen Immunisierung wurde an insgesamt 1800 weißen Mäusen untersucht, in welchem Maße der Impferfolg von der Wahl des erregerentsprechenden Applikationsortes abhängig ist und ob der Zusatz von Dimethylsulfoxyd (DMSO) zum ~~Immun~~ogen den Impferfolg verbessern kann.

- 1) Die Mortalität der weißen Maus nach oraler Infektion mit *S. typhi murium* wird durch orale, nasale und rektale Immunisierung mit den homologen, hitzeinaktivierten Keimen statistisch signifikant gesenkt.
- 2) Statistisch signifikante Unterschiede für die verschiedenen Applikationsorte konnten nicht nachgewiesen werden. Anhand dieses Ergebnisses wird der Begriff der Gewebsimmunität diskutiert.
- 3) Der Zusatz von DMSO zum Impfstoff erbrachte keine Verbesserung der Impferfolge, sondern führte in allen Fällen zu schlechteren Ergebnissen. Die möglichen Gründe hierfür werden diskutiert.

SCHRIFTTUM

- 1) ADAMS, G.A.: Extraction of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria with Dimethyl Sulfoxide. Canad.J.Biochem. 45, 422 (1967)
- 2) BESREDKA, A.: Die lokale Immunisierung. Leipzig 1926
- 3) -- Über lokale Immunisierung. Naturwissenschaften 15, 395 (1927)
- 4) BUBLITZ, G. u.G. GRIES: Zur Wirkung von Dimethylsulfoxyd. Pharmakologische und klinische Ergebnisse. Z.Ärztl.Fortbildung 55, 867 (1966)
- 5) CHVOSTEK, F.: Zur Frage der Immunisierung per os. Wien.Klin.Wschr. 1908, S. 453
- 6) COMBIESCU, D. u.G. CALALB: De l'immunisation contre le Staphylocoque pyogène par voie buccale, chez le lapin. Compt.Rend. Soz.Biol. 91, 734 (1924)
- 7) COURMONT, J. u. ROCHAIX: La vaccination antityphique par la voie intestinale. Compt.Rend.Acad.Scienc. 1911/12, S. 152
- 8) CSAKY, T.Z. a. P.M. HO: Effect of Dimethylsulfoxide on the intestinal sugar transport. Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 122, 860 (1965)
- 9) DEMPE, H.: Perorale Immunisierung mit abgetöteten Krankheitserregern bei jungen und erwachsenen Säugetieren und Vögeln. Z. Hyg.Infkrh. 112, 80 (1931)
- 10) DIETRICH, W.: Resorption von Tetanusgift durch den Darm. Klin.Wschr. 1, 1160 (1922)

- 11) DILLER, W. u.P. BÜNGER: Zur Pharmakokinetik der rektalen Applikation, dargestellt am Beispiel des 4-Sulfanilamido-5,6-dimethoxypyrimidins.
1. Mitteilung: Methodischer Teil. Arzneim.Forsch. 15, 1274
2. Mitteilung: Experimenteller Teil. Arzneim.Forsch. 15, 1445 (1965)
- 12) DIXON, R.L. et al.: Apparent lack of interaction between Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and a variety of drugs. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 118, 756 (1965)
- 13) EBEL, D.: Über die Permeabilität der Darmschleimhaut für artfremde Proteine. Z.f.Kinderheilkunde 79, 8 (1957)
- 14) EHRICH, W.: Die cellulären Bildungsstätten der Antikörper. Klin.Wschr. 33, 315 (1955)
- 15) -- Morphologie und Physiologie der Antikörperbildung. Verh.Deutsch.Ges.Path. 46, Tagung, 10 (1962)
- 16) ELBERG, S.S.: Cellular immunity. Bact.Rev. 24, 67 (1960)
- 17) FARAGO, P.: Die Bedeutung unspezifischer Adsorbentien auf dem Gebiete der Immunitätslehre. Klin.Wschr. 20, 815 (1941)
- 18) FARRANT, J.: Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. Nature 205, 1284 (1964)
- 19) FEINMAN, H.; M. BEN et al.: The toxicology of Dimethyl Sulfoxide. The Pharmacologist 1964, 8.188

- 20) FICKER, M.: Über die Keimdichte der normalen Schleimhaut des Intestinaltraktes. Arch.Hyg. 52, 179 (1905)
- 21) -- Über die Aufnahme von Bakterien über den Respirationsapparat. Arch.Hyg. 53, 50 (1905)
- 22) -- Einfluß des Hungers auf die Bakterien-durchlässigkeit des Intestinaltraktes. Arch.Hyg. 54, 354 (1905)
- 23) -- Über den Einfluß der Erschöpfung auf die Keimdurchlässigkeit des Intestinaltraktes. Arch.Hyg. 57, 56 (1906)
- 24) FINDER, J.; A.F. LASH a. J. SIMONS: Antigenic absorption through intact vaginal mucosa in humans. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 27, 386 (1930)
- 25) FRÄNKEL, E. u.E. SCHULTZ: Versuche zur Frage der peroralen Immunisierung. Perorale Immunisierung bei der Maus gegen Paratyphus B. Z.f.Immunforsch. 53, 478 (1927)
- 26) FRATTINI, J.: Consideraciones biofisiquimidas sobre inmunización antitífica. Rev.Sanid.Milit.Argent. 53, 61 (1954)
- 27) FRETER, R.: Detection of coproantibody and its formation after parental and oral immunization of human volunteers. J. Infect.Diseases 111, 37 (1962)
- 28) FRETER, R. a. E. GANGAROSA: Oral immunization and production of coproantibody in human volunteers. J. Immunol. 91, 724 (1963)

- 29) FRENGER, W.: Humorale und zelluläre Abwehr des Organismus. *Materia Med. Nordmark* 16, 109 (1964)
- 30) FRITZE, E.: Celluläre und humorale "Abwehr"-Systeme und -Reaktionen. *Ergebn. Inn. Med. Kinderheilkunde* 9, 282 (1958)
- 31) GAY, F.P.: On local and general immunity. *J. Immunol.* 8, 1 (1923)
- 32) GEHRING, F.: Dimethylsulfoxyd als Extraktionsmittel für Staphylokokkenantigene. Nachweis im Immunodiffusionstest. *Naturwissenschaften* 54, 372 (1967)
- 33) GERHARDS, E.; E. GIBIAN et al.: Stoffwechsel und Stoffwechselwirkungen von Dimethylsulfoxyd. *Arzneim. Forsch.* 15, 1295 (1965)
- 34) GIORGI, G. u. G. SEGRE: Dimethylsulfoxyd und die intestinale Resorption von p-Aminohippursäure. DMSO-Symposium Wien 1966. Saladruck Berlin 1966
- 35) GÜNZEL, F. u. K.-D. RICHTER: Verträglichkeit von Dolicur (DMSO) bei langdauernder Anwendung im Tierversuch. DMSO-Symposium 1965 Dolicur. Saladruck Berlin 1965
- 36) HAUPTNER, H. (Instrumentenfabrik für Veterinärmedizin): Katalog A, nr. 1719, Solingen 1963
- 37) HAUSLER, G. u. U. JAHN: Untersuchungen zur Pharmakologie von Dimethylsulfoxyd (DMSO). *Arch. Internat. Pharmacodyn. Therapie* 159, 368 (1966)

- 38) HOFFMANN, M.: Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsviraemie von T_3 -Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe. Zbl.f.Bakt. I Orig. 198, 371 (1965)
- 39) HORITA, A. a. L.J. WEBER: Skin penetrating property of drugs dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and other vehicles. Life Sciences 3, 1389 (1964)
- 40) IBRAHIM, H.: Versuche über den Immunisierungseffekt auf verschiedene Weise applizierter Antigene. Z.f.Immunforschung 1929, S. 219
- 41) JACOB, S.W.; M. BISCHEL a. R.J. HERSCHLER: Dimethyl Sulfoxide: Effects on the permeability of biologic membranes. (Preliminary report). Current Therapeutic Research 6, 193 (1964)
- 42) JACOB, S.W. a. E. ROSENBAUM: The toxicology of Dimethyl Sulfoxide. Headache 6, 127 (1966)
- 43) KAHN, R.L.: Tissue response in immunity. Ann.N.Y. Acad.Sci. 59, 281 (1955)
- 44) KELLER, W.: Die enterale Resorption. Klin.Wschr. 11, 855 (1932)
- 45) KLIGMAN, A.M.: Topical pharmacology and toxicology of Dimethyl Sulfoxide. JAMA 193, 796 u. 923 (1965)
- 46) KLUCHIN, S. u.G. WIGODSCHIKOFF: Experimentelle Bewertung der Cholera-vaccinationsmethode per os. Zbl.f.Bakt.I Orig. 94, 6 (1924)
- 47) KOLB, K.; H. JANICKI et al.: Das Verhalten von ^{35}S -markiertem Dimethylsulfoxyd im menschlichen und tierischen Organismus. Arzneim.Forsch.15, 1292 (1965)

- 48) KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Verlag Steinkopp, Dresden und Leipzig 1940.
- 49) KORTH, W.: Weitere Untersuchungen über die Wirkung von Trypsin auf bakterielle Toxine, Bakterienwachstum, Agglutinine und Penicillase. *Arzneim. Forsch.* 4, 388 (1954)
- 50) KOSHLAND, M.E. a. W. BURROWS: quantitative studies of the relationship between faecal and serum antibody. *J. Immunol.* 65, 93 (1950)
- 51) KRIZEK, T.J. a. J.H. DAVIS: Bacteriostatic qualities of Dimethyl Sulfoxide. *Surgical Science Club, Midwest Section S.* 849 (1964)
- 52) LIETZ, B. u.H. RAETTIG: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. V.Mitteilung: Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Dyspepsiecoli. *Zbl.f.Bakt. I Orig.*, 204, 543 (1967)
- 53) VAN DE LOO, J.: Über die Lokalisation der Antikörperbildung nach aerogener Immunisierung. *Virchows Arch. Path.Anat.* 333, 40 (1960)
- 54) LUSENA, M. u.ROVIDA, G.: Immunita locale e vaccinazione per via enterica nel tifo e paratifo B. *Ricerche Sperim.Boll.Dell.Istit.Sieroterap.Milanese* 5, 19 (1926)
- 55) MALLACH, H.J. u. K. ETZLER: Tierexperimentelle Untersuchungen über die gemeinsame Wirkung von Dimethylsulfoxyd und Äthylalkohol. *Arzneim.Forsch.* 15, 1305 (1965)

- 56) MARWIK, G.: Tierversuche zur Inhalationsimpfung mit inaktivierten *S. typhi murium*-Bakterien. Med.Inaug.Diss. FU Berlin 1966
- 57) MEWES, M.: Aufnahme und Verteilung von radiomarkiertem Antigen von *S. typhi murium* in der Maus bei oraler, rektaler und subcutaner Anwendung. Med.Inaug.Diss. FU Berlin 1966
- 58) MITCHELL, H.L.: A simple method of permanent staining of intestinal parasites, using Dimethylsulfoxide as a solvent. Am.J.Clin.Path. 45, 363 (1966)
- 59) MIZUTANI, A.: Experimental studies on immunization through respiration. (Appearance of antibodies by inhaling sprayed typhoid and dysentery vaccines). Acta Dermat. 26, 93 (1935)
- 60) -- Experimental studies on the (per anal) immunization by bacterial vaccines (typhoid-dysentery group). Acta Dermat. Kyoto 27, 15 (1936)
- 61) MONTES, L.F.; J.L. DAY et al.: Ultrastructural changes in the stratum corneum after profuse swabbing of the skin with Dimethyl Sulfoxide. Experientia 23, 616 (1967)
- 62) MÖRSDORF, K.: Ein Beitrag zur Pharmakologie von Dimethylsulfoxyd (DMSO). Med.Pharmacol.Exp. 15, 55 (1966)
- 63) MUFTIC, M. u. U. REDMANN: Färbung von säurefesten Mikroorganismen durch in Dimethylsulfoxyd gelöste Farbstoffe. Zbl.f.Bakt. I Orig. 200, 76 (1966)

- 64) ORMSBEE, R.A.; E.J. BELL et al.: Antigens of *Coxiella burnetii*. I. Extraction of antigens with nonaqueous organic solvents. *J. Immunol.* 88, 741 (1967)
- 65) PRIGGE, R.: Die Beziehung zwischen dem Antigengehalt der Diphtherieimpfstoffe und ihrer Wirksamkeit. *Klin.Wschr.* 27, 685 (1945)
- 66) PUIG MUSET, P. a. J. MARTIN-ESTEWE: Physiological cell permeability and pharmacological action of DMSO. *Experientia* 21, 649 (1965)
- 67) RAETTIG, H.: Erfahrungen und vergleichende Betrachtungen über die Erfolge der parenteralen und peroralen Typhusschutzimpfung. *Z.f.Immunforsch.* 108, 165 (1950)
- 68) -- Tierexperimente zur oralen Immunisierung mit inaktiviertem Antigen. Vorläufige Mitteilung. *Zbl.f.Bakt. I Orig.* 182, 525 (1961)
- 69) -- Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen (Typhus, Paratyphus, Cholera, Ruhr). *Zbl.f.Bakt. I Ref.* 183, 1 (1962)
- 70) -- Neues zur Wirkungsweise der oralen Immunisierung. *Wien.Med.Wschr.* 3, 33 (1965)
- 71) -- Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1. Mitteilung: Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus gegen eine Enteritis-Infektion. *Zbl.f.Bakt. I Orig.* 193, 398 (1964)

- 71a) -- Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 2.Mit-
teilung: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung
bei der Enteritis-Infektion der Maus. Zbl. f.Bakt.
I Orig. 197, 368 (1965)
- 72) -- Möglichkeiten des DMSO in der experimen-
tellen Immunologie. DMSO-Symposium Wien 1966. Sala-
druck Berlin 1966
- 73) -- Orale Immunisierung mit nichtvermehrungs-
fähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
3. Mitteilung: Dosierung und Impfrhythmus bei der
spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-
Enteritis. Zbl.f.Bakt. I Orig. 203, 478 (1967)
- 74) RAUSS, K. a. I. KETYL: Serum- and coproantibodies
in mice, immunized perorally with Shigella flexneri.
Zschr.f.Immunforschg. 127, 37 (1964)
- 75) REITER, H.: Versuche über perorale Immunisierung.
Dtsch.Med.Wschr. 52, 946 (1926)
- 76) SANARELLI, G.: Sur les vaccinations par voie nasale.
Zbl.f.Bakt. I Ref. 79, 344 (1925)
- 77) SCHIESSLE, W.: Über die Vorgänge bei der Inhalation
von Aerosolen in der normalen Lunge. Zschr.
Aerosolforsch. Therapie 2, 364 (1953)
- 78) SCHMIDT-MENDE, U. u.F. EISENBERGER: Möglichkeiten
und Grenzen der Gefrierkonservierung von Geweben
und Organen. Münch.Med.Wschr. 108, 1668 (1966)
- 79) SOMMER, S. u.G. TAUBERGER: Toxikologische Untersu-
chungen mit DMSO. Arzneim.Forsch. 14, 1050 (1964)

- 80) SPENCER, R.P. a. F.E. VISHNO: Inhibition of intestinal aminoacid transport by DMSO. *Biochem.Pharmacol.* 15, 399 (1966)
- 81) DI STEFANO, V. a. J. KLAHN: Observations on the pharmacologic and hemolytic activity of Dimethyl Sulfoxide. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 7, 660 (1965)
- 82) STINEBRING, W.R. a. J.S. YOUNGNER: Patterns of interferon appearances in mice injected with bacteria or bacterial endotoxin. *Nature* 204, 712 (1964)
- 83) STOUGHTON, R.B. et al.: Influence of DMSO on human percutaneous absorption. *Arch.Dermat.Chicago* 90, 512 (1964)
- 84) TORIKATA, R. a.M. IMAIZUMI: Zum Unterschied zwischen der Injektions- und der oralen Immunisierung. *Zschr. Immunforsch.* 94, 342 (1938)
- 85) TRON, G.: Ulteriore contributo allo studio della entero-vaccinazione antitifoparatifico. *Boll.Ist. Sieroter.Milan.* 8, 445 (1929) Ref.: *Zbl.f.Bakt.* I Ref. 96, 544 (1929/30)
- 86) TSUCHIYA, T.; S. IRIYAMA et al.: The formation of Methyl Methanethiolsulfonate, an antibacterial substance, from Dimethyl Sulfoxide. *Bull.Chem.Soc. Jap.* 37, 286 (1964)
- 87) VERZAR, F.: Aufsaugung und Ausscheidung von Stärkekörnern. *Biochem.Zschr.* 34, 86 (1911)
- 88) VOLKHEIMER, G.: Durchlässigkeit der Darmschleimhaut für groBkorpuskuläre Elemente (Herbst-Effekt). *Z. Gastroent.* 2, 57 (1964)

- 89) VOSS, H.: Virus und Polyelektrolyte. Zbl.f.Bakt. I.Orig. 193, 1 (1964)
- 90) WALDMANN, A.: Morphologische Untersuchungen über Breslauf-Infektion bei vaccinierten Kaninchen. Zbl.f.Bakt.I Orig. 137, 45 (1936)
- 91) WALSER, K.: Experimentelle Untersuchungen über Dimethylsulfoxyd (DMSO) als Resorptionsvermittler an der Euterhaut von Kühen. (Vorläufige Mitteilung). Berl.u. Münch.Tierärztl.Wschr. 79, 241 (1966)
- 92) WALSH, T.E. a. P.R. CANNON: Immunization of the respiratory tract. A comparative study of the antibody content respiratory and other tissues following active, passive and regional immunization. J.Immunol. 35, 31 (1938)
- 93) v. WASSERMANN u. CITRON: Über die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper. Z.Hyg.Infekt.Krh. 50, 332 (1905)
- 94) WIDDOWSON, J.P.: Bacillus pantotheticus spores activated by Dimethyl Formamide and Dimethyl Sulfoxide. Nature 214, 812 (1967)
- 95) WILSON, J.E.; D.E. BROWN a. E.K. TIMMENS: A toxicologic study of Dimethyl Sulfoxide. Toxicol.Appl.Pharmacol. 7, 104 (1965) Ref.: Ber.Ges.Biol. B 274, 111 (1965)
- 96) YEHLE, E.O. a. R. DOI: Stabilization of Bacillus subtilis phage with DMSO. Canad.J.Microbiol. 11, 745 (1965)

Herrn Prof.Dr.med. Hansjürgen R a e t t i g
danke ich für die Überlassung des Themas und
für viele wichtige Anregungen.

Der S c h e r i n g AG, Berlin, danke ich
für materielle Hilfe bei Durchführung der Ver-
suche und für die Bereitstellung der Versuchs-
substanzen Dolicour^R und Carbopol^R.

Der B e h r i n g w e r k e AG, Marburg,
danke ich für die Überlassung des S. typhi
murium-Impfstoffes ebenfalls.

LEBENS LAUF

Am 23.8.1940 bin ich als drittes Kind des Physikers Dr. Paul Schmudde und seiner Ehefrau Alix, geb. von Herder, in Berlin geboren.

Im September 1946 wurde ich eingeschult, besuchte sechs Jahre verschiedene Grundschulen Berlins, anschließend sieben Jahre die Hildegard-Wegscheider-Schule (OWZ) in Berlin-Grünwald, wo ich im März 1959 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1959 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Medizin. Bis auf ein klinisches Semester an der Ludwig Maximilian-Universität in München habe ich ausschließlich an der Freien Universität Berlin studiert. Hier bestand ich am 12.11.1965 das medizinische Staatsexamen.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistentin tätig.

